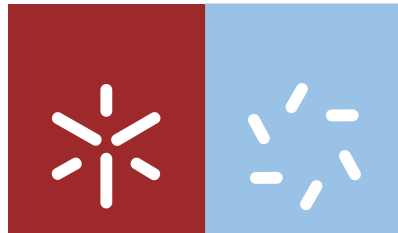


Tânia Alexandra Machado Morais de Sousa

Efeito do metalaxil na resposta do sistema antioxidante de *Solanum nigrum* L. - estudo em células em suspensão e em plantas intactas



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Tânia Alexandra Machado Morais de Sousa

**Efeito do metalaxil na resposta do
sistema antioxidante de *Solanum nigrum* L.
- estudo em células em suspensão e em
plantas intactas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora Fernanda Fidalgo
e co-orientação do
Professor Doutor Jorge Teixeira

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS
DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE
COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

À memória do meu pai José Cândido de Sousa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de expressar o mais profundo agradecimento à Professora Doutora Fernanda Fidalgo por ter sido orientadora deste trabalho, pelo apoio, incentivo, paciência e constante disponibilidade prestada ao longo do mesmo. Pelo encorajamento e amabilidade prestadas nos momentos de desânimo e pela sua contribuição na minha formação científica.

Ao Professor Doutor Jorge Teixeira, meu co-orientador, manifesto a minha gratidão pelas sugestões e simpatia demonstradas ao longo deste trabalho.

O meu agradecimento ao Professor Doutor Manuel Azenha e a toda a sua equipa pela disponibilidade manifestada para as quantificações de metalaxil.

Aos meus colegas de laboratório em especial ao Pedro, Nuno e Tiago pela boa disposição que os caracterizam.

Aos colegas de outros laboratórios, especialmente ao Ricardo, Bruno, à Marta e à Sara por toda a animação que tivemos juntos durante este trabalho.

À Sofia pela disponibilidade prestada quando solicitada, especialmente pela ajuda nas formatações.

A todos os meus amigos especialmente ao Miguel, Nuno, Alexandra e Ana pela amizade e companheirismo demonstrado ao longo de todos estes anos.

À doutora Filomena Coutinho por aturar os medos, inseguranças e crises existenciais, por me ajudar a ultrapassá-los sempre com boa disposição.

À minha mãe por tentar compreender as escolhas que faço, apesar de não concordar com muitas delas.

A todos que não mencionei, mas que de algum modo comigo colaboraram, um muito obrigada.

RESUMO

Efeito do metalaxil na resposta do sistema antioxidante de *Solanum nigrum* L. – estudo em células em suspensão e em plantas intactas

O Ridomil é um fungicida correntemente utilizado na prática agrícola sendo efetivo no tratamento de fungos pertencentes à ordem Peronosporales. Sendo este fungicida estável face a amplas faixas de pH, luminosidade e temperatura é indispensável o desenvolvimento de estratégias de remediação para este composto, de modo a assegurar uma produtividade agrícola sustentável com o menor impacto ambiental possível. Considerando a tendência de acumulação deste agroquímico nos solos e cursos de água, o presente trabalho teve como objetivo estudar respostas fisiológicas e bioquímicas associadas ao sistema antioxidante, resultantes da aplicação do Ridomil a culturas de células em suspensão e a plantas intactas de *Solanum nigrum* L.. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento das células em suspensão com Ridomil (71.60 e 143.20 μM) resultaram numa diminuição da biomassa e viabilidade celular, sendo essa diminuição mais acentuada nas células propagadas na concentração mais elevada do fungicida. A exposição das células em suspensão ao Ridomil resultou no estabelecimento de stress oxidativo, comprovado pelo aumento nos níveis de TBARS e de H_2O_2 observados ao longo do ciclo cultural e com maior incidência na concentração mais elevada do fungicida. A quantificação da prolina mostrou a ativação do sistema antioxidante não enzimático na resposta das células em suspensão ao Ridomil. Os níveis de prolina aumentaram consideravelmente ao longo do ciclo cultural, sendo porém mais elevados na maior concentração de fungicida utilizada. O Ridomil teve um efeito positivo na atividade de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT e APX). A quantificação dos níveis de Ridomil mostrou uma diminuição desses níveis 5 h após a exposição das células em suspensão ao fungicida.

O Ridomil teve efeito negativo em diversos parâmetros biométricos avaliados em plântulas de *S. nigrum*. Este fungicida resultou também no estabelecimento de stress oxidativo na parte aérea das plantas, no entanto, variações nos níveis de TBARS e clorofilas não foram observados o que mostra a efetividade do sistema antioxidante. A prolina bem como a SOD, CAT e APX exibiram um efeito protetor contra as ROS na parte aérea das plantas, tendo a APX um papel mais ativo na remoção do H_2O_2 . Nas raízes verificou-se um aumento nos níveis de TBARS e de H_2O_2 . Nestes órgãos a concentração mais elevada teve um efeito negativo nos sistemas de defesa antioxidantes como se pode observar pela diminuição nos níveis da prolina.

ABSTRACT

Effect of metalaxyl on antioxidant system response in *Solanum nigrum* L. – study on cell suspensions and intact plants

Ridomil is a fungicide commonly used in agricultural practice being effective in the treatment of fungi belonging to Peronosporales order. Being this fungicide stable in wide pH, luminance and temperature ranges it is essential to develop remediation strategies for this compound in order to ensure a sustainable agricultural productivity with the lowest environmental impact possible. Considering the trend of accumulation of this agrochemical in soils and watercourses the present work aimed to study physiological and biochemical responses associated with the antioxidant system resulting from the application of Ridomil in cell suspensions and intact plants of *Solanum nigrum* L.. The results obtained showed that the treatment of cell suspensions with Ridomil (71.60 and 143.20 μM) resulted in a decrease in biomass and cell viability, being this decrease more pronounced in cells propagated at the highest concentration of the fungicide. Exposure of cell suspensions to Ridomil resulted in the establishment of oxidative stress corroborated by the increase of TBARS and H_2O_2 levels observed along the cultural cycle with higher incidence at the highest concentration of the fungicide. Quantification of free proline showed the activation of the non-enzymatic antioxidant system of cell suspensions in response to Ridomil. Proline levels increased considerably over the cultural cycle, being more pronounced at the highest concentration of fungicide. Ridomil had a positive effect on the activity of enzymes belonging to the enzymatic antioxidant system (SOD, CAT and APX). Quantification of Ridomil 5 h after exposure of cell suspensions, showed a decrease in the levels of the compound.

Ridomil had a negative effect on the diverse biometric parameters evaluated in seedlings of *S. nigrum*. This fungicide also resulted in the establishment of oxidative stress in plant shoots, however, no variations on TBARS and chlorophylls levels were detected showing the effectiveness of the antioxidant system. Proline as well as SOD, CAT and APX exhibited a protective effect against ROS in plant shoots, with APX having a more active role in scavenging H_2O_2 . Increases of TBARS and H_2O_2 levels were observed in roots. In these organ the highest concentration had a negative effect on antioxidant defense systems as shown by the decrease in the levels of proline.

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amónio
APX	Peroxidase do ascorbato
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
GSH	Glutathiona
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
KCN	Cianeto de potássio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
NADPH	Nicotiamina adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitrozul de tetrazólio
O ₂	Oxigénio molecular
O ₂ ⁻	Anião superóxido
¹ O ₂	Singleto de oxigénio
OH	Radical hidróxilo
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PSII	Fotossistema II
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Rubisco	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TEMED	Tetrametiletenodiamina

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Pesticidas	
1.1. Pesticidas e seu uso corrente na prática agrícola	1
1.2. Definição e classificação de fungicidas	1
1.3. Metalaxil	2
2. Fitorremediação	3
2.1. Definição, vantagens e limitações	4
2.2. Mecanismos de fitorremediação	
2.3. Fitorremediação de contaminantes orgânicos	6
2.4. Fitorremediação do metalaxil	8
3. Stress oxidativo	9
3.1. Espécies reativas de oxigênio	9
3.2. Sistemas de defesa antioxidante	13
3.2.1. Sistema antioxidante enzimático	14
3.2.2. Sistema antioxidante não enzimático	16
4. <i>Solanum nigrum</i> L., origem e propriedades	20
4.1. <i>Solanum nigrum</i> L. em estudos de fitorremediação de contaminantes orgânicos	21
5. Culturas <i>in vitro</i>	21
5.1. Utilização de culturas <i>in vitro</i> em estudos de fitorremediação	21
5.2. Culturas <i>in vitro</i> de <i>Solanum nigrum</i> L. e sua utilização em estudos de fitorremediação	22
5. Objetivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Cultura de células em suspensão de <i>Solanum nigrum</i> L.	
1.1. Indução e estabelecimento da cultura de células em suspensão de <i>Solanum nigrum</i> L.	24
1.2. Avaliação da cinética de crescimento	26
- Determinação do peso fresco e do peso seco	26
2. Estudos na cultura de células em suspensão de <i>Solanum nigrum</i> L.	26
- Características do fungicida	27
2.1. Preparação dos meios de cultura suplementados com Ridomil®Gold SL	27
2.2. Avaliação da cinética de crescimento de células em suspensão propagadas em meios de cultura suplementados com Ridomil®Gold SL	28
- Determinação do peso fresco e do peso seco	28
2.3. Análise da viabilidade celular	28
2.4. Processamento das células em suspensão	30
3. Determinações bioquímicas	30
3.1. Avaliação do dano membranar	30
3.2. Quantificação do peróxido de hidrogênio	32
3.3. Quantificação do teor de prolina livre	32

3.4. Análise da acumulação de polipeptídeos por SDS-PAGE	32
- Extracção e quantificação	32
- Determinação do padrão de proteínas solúveis	33
3.5. Extracção de enzimas do sistema antioxidante enzimático	34
- Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	34
- Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)	35
- Ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)	35
3.6. Quantificação da atividade da SOD, CAT e APX por espectrofotometria	35
- Quantificação da SOD	35
- Quantificação da CAT	36
- Quantificação da APX	36
3.7. Estudo da atividade da SOD, CAT e APX em géis nativos de poliacrilamida	37
- Atividade da SOD	37
- Atividade da CAT	38
- Atividade da APX	40
3.8. Análise densitométrica dos géis	41
4. Quantificação do metalaxil por cromatografia gasosa com detecção de espectrofotometria de massa	42
- Preparação das amostras e padrões de calibração	42
- Microextração em fase sólida (SPME)	42
- Análise GC-MS	43
5. Estudos <i>in vivo</i>	43
5.1. Efeito do Ridomil na germinação de sementes de <i>Solanum nigrum</i> L.	43
5.2. Biometria das plântulas expostas a concentrações crescentes do fungicida em estudo	44
5.3. Efeitos do Ridomil no crescimento e desenvolvimento das plantas	44
5.4. Determinações bioquímicas	45
- Avaliação do dano membranar	45
- Quantificação do peróxido de hidrogénio	45
- Quantificação do teor de prolina livre	45
- SDS-PAGE	45
- Quantificação dos pigmentos fotossintéticos	45
- Estudo da actividade da SOD, CAT e APX em géis nativos de poliacrilamida	46
6. Análise estatística dos resultados	46
III. RESULTADOS	47
1. Cultura de células em suspensão de <i>Solanum nigrum</i> L.	47
2. Intervalo de subcultivo	49
- Peso fresco	49
- Peso seco	51
3. Avaliação da cinética de crescimento de células em suspensão propagadas em meios de cultura suplementados com Ridomil® Gold SL	52
- Peso fresco	52
- Peso seco	54

4. Avaliação da viabilidade celular com azul de tripano	56
5. Determinações bioquímicas	61
- Avaliação do dano membranar	61
- Quantificação do peróxido de hidrogênio	63
- Prolina	65
- Proteínas solúveis	67
6. Efeitos do Ridomil nos níveis de atividade da SOD, CAT e APX	69
- SOD	69
- CAT	73
- APX	74
7. Cromatografia gasosa	76
8. Avaliação de parâmetros biométricos de plântulas de <i>Solanum nigrum</i> L.	79
- Germinação de sementes de <i>Solanum nigrum</i> L.	79
- Comprimento da raiz primária	80
- Comprimento das raízes laterais	81
- Altura da parte aérea	82
- Número de folhas	83
- Biomassa	84
9. Determinações bioquímicas	85
- Peroxidação lipídica	85
- Peróxido de hidrogênio	86
- Prolina	88
- Pigmentos fotossintéticos	89
- Proteínas solúveis e SDS-PAGE	90
10. Efeitos do Ridomil nos perfis eletroforéticos da SOD, CAT e APX	92
- SOD	92
- CAT	93
- APX	93
IV. DISCUSSÃO	95
1. Estudos <i>in vitro</i>	95
2. Estudos <i>in vivo</i>	104
V. CONCLUSÕES	109
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	112
VII. BIBLIOGRAFIA	113

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das várias tecnologias de fitorremediação. (A) Fitodegradação, fitovolatilização, fitoextração, fitoestabilização e fitoestimulação. (B) Rizofiltração. Adaptado de Pilon-Smits (2005).
- Figura 2.** Processos bioquímicos envolvidos na desintoxicação dos xenobióticos. Adaptado de Abhilsh *et al.* (2009).
- Figura 3.** Equilíbrio entre a produção e remoção de ROS pelo sistema antioxidante. Adaptado de Gill & Tuteja (2010).
- Figura 4.** Reações de redução do oxigênio e formação de ROS. Adaptado de Scandalios (1993).
- Figura 5.** Sistemas de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático). Adaptado de Buchanan (2000).
- Figura 6.** *Solanum nigrum* L. Adaptado de Edmonds & Chweya(1997).
- Figura 7A-B** Câmara de Neubauer. **A** - Representação fotográfica da câmara de Neubauer. **B** - Imagem ilustrativa das divisões da câmara de Neubauer nas quais se procedeu à contagem das células.
- Figura 8A-B** Tecido caloso de *Solanum nigrum* L. **A** – Tecido caloso crescido durante 28 dias em meio de manutenção. **B** – Pormenor do tecido caloso ilustrado na fotografia anterior, onde é claramente visível a cor verde do mesmo.
- Figura 9A-B** Culturas de células em suspensão de *Solanum nigrum* L. **A** – Culturas de células propagadas durante 13 dias em meio de indução. **B** – Pormenor dos pequenos aglomerados celulares aderentes à superfície vítrea do matraz (setas), o que indica a existência de uma biomassa considerável.
- Figura 10A-D** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. observadas em microscópio de campo claro numa ampliação 10X. Imagens ilustrativas que demonstram a ausência de qualquer infeção bacteriana ou fúngica. É de referir a existência de fragmentos celulares em algumas imagens (setas).
- Figura 11.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 7 dias após o subcultivo na ausência de fungicida.
- Figura 12.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 13 dias após o subcultivo na ausência de fungicida.
- Figura 13.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 7 dias após o subcultivo na presença de 41,60 μM de fungicida.
- Figura 14.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 13 dias após o subcultivo na presença de 41,60 μM de fungicida.
- Figura 15.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 7 dias após o subcultivo na presença de 143,20 μM de fungicida.
- Figura 16.** Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 13 dias após o subcultivo na presença de 143,20 μM de fungicida.
- Figura 17.** Perfil eletroforético dos polipeptídeos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, no fim do ciclo cultural (dia 13). Os polipeptídeos foram visualizados no gel através da coloração com azul de Coomassie. M – marcador molecular; setas – polipeptídeos cuja acumulação variou.
- Figura 18.** Detecção da atividade das SOD em gel nativo, no qual foram utilizadas 70 μg de proteína de extratos de células em suspensão da situação controlo e das situações de tratamento com Ridomil (71,60 e 143,20 μM). A sensibilidade da SOD ao KCN (B) e ao H_2O_2 (C) foi usada para distinguir os 3 tipos de SOD: (SOD1, 2, 3, 4, 5 = MnSOD; SOD6 = FeSOD; SOD7 = CuZn/SOD. A intensidade relativa das bandas de atividade nas várias situações foi quantificada por análise densitométrica e comparada com a intensidade das bandas controlo definida como 100%.
- Figura 19.** Padrão de atividade da catalase obtido em gel nativo ao fim de 13 d, com duas isoenzimas identificadas: CAT 1 e CAT 2. Foram aplicados 40 μg de proteínas.
- Figura 20.** Avaliação em gel nativo do efeito do Ridomil na atividade da peroxidase do ascorbato nas células em suspensão nos diferentes tratamentos: 0; 71,60 e 143,20 μM de Ridomil. Foram aplicados 20 μg de proteína.
- Figura 21.** Foto de plântulas de *Solanum nigrum* L., submetidas a tratamentos com concentrações crescentes de Ridomil, 28 dias após exposição ao fungicida.
- Figura 22.** Padrão de polipeptídeos de partes aéreas de plantas cultivadas na ausência e na presença de 44,75 e 89,5 μM de Ridomil. Os polipeptídeos foram visualizados no gel através da coloração com azul de Coomassie. M – marcador de massa molecular; setas – polipeptídeos cuja acumulação variou.
- Figura 23.** Efeito do Ridomil na atividade das SOD em gel nativo na parte aérea de plantas sujeitas aos diferentes tratamentos: 0; 44,75 e 89,5 μM . Foram aplicadas 20 μg de proteínas. Foram identificadas os seguintes tipos de acordo com os seus inibidores: 1 – MnSOD; 2,3,4 – FeSOD; 5,6 – Cu/ZnSOD.

Figura 24. Atividade da catalase nos diferentes tratamentos das plantas com Ridomil por gel nativo, tendo sido identificadas duas isoenzimas: CAT 1 e CAT 2. Foram aplicados 25 µg de proteínas.

Figura 25. Atividade da peroxidase do ascorbato determinada em gel nativo para os diferentes tratamentos, com cinco isoenzimas detetadas. Foram aplicados 35 µg de proteínas.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Variação do peso fresco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas em meio MS. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 2.** Variação do peso seco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas em meio MS. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 3.** Variação do peso fresco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 4.** Variação do peso seco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 5.** Percentagem da viabilidade celular da cultura de células em suspensão 168 h (7 dias) após o subcultivo em 0; 71,60 e 143,20 µM de Ridomil. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 6.** Percentagem da viabilidade celular da cultura de células em suspensão 312 h (13 dias) após o subcultivo em 0; 71,60 e 143,20 µM de Ridomil. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 7.** Níveis de TBARS quantificados em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 8.** Níveis de H₂O₂ quantificados em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 9.** Teor de prolina quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 10.** Teor de proteínas solúveis quantificadas em extratos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 11.** Quantificação da superóxido dismutase em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 12.** Quantificação da catalase em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 13.** Quantificação da peroxidase do ascorbato em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 14.** Quantificação do metalaxil em meios de cultura após filtração das células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 15.** Quantificação do metalaxil em meios de cultura não inoculados mantidos na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 16.** Percentagem de germinação de sementes de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 17.** Comprimento da raiz das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 18.** Comprimento das raízes laterais das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 19.** Altura da parte aérea das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 20.** Número de folhas das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 21.** Biomassa total das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Gráfico 22.** Níveis de TBARS quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.
- Gráfico 23.** Níveis de H₂O₂ quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.

- Gráfico 24.** Teor de prolina quantificado em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.
- Gráfico 25.** Variações na quantidade de pigmentos na parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.
- Gráfico 26.** Proteínas solúveis na parte aérea de plantas cultivadas na ausência e na presença de 44,75 e 89,5 μ M de Ridomil. Valores expressos como médias \pm SEM.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) recorrendo ao peso fresco.
- Tabela 2.** Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) recorrendo ao peso seco.
- Tabela 3.** Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão propagadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com Ridomil Gold SL®.
- Tabela 4.** Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão propagadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com Ridomil Gold SL®.
- Tabela 5.** Viabilidade celular na cultura de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 6.** Níveis de TBARS quantificados em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 7.** Níveis de H₂O₂ quantificados em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 8.** Teor de prolina quantificado em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 9.** Teor de proteico solúvel em extratos de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®, no fim do ciclo cultural.
- Tabela 10.** Quantificação da atividade da SOD em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®, por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).
- Tabela 11.** Quantificação da atividade da CAT em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®, por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).
- Tabela 12.** Quantificação da atividade da APX em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®, por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).
- Tabela 13.** Concentrações de metalaxil quantificado em meio de cultura após filtração das células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 14.** Concentrações de metalaxil quantificado em meio de cultura mantido na ausência e na presença de 71,60 μ M e 143,20 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 15.** Percentagem de germinação de sementes de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 16.** Comprimento da raiz das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 17.** Comprimento das raízes laterais das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 18.** Altura da parte aérea das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 19.** Número de folhas das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 20.** Biomassa total das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.
- Tabela 21.** Níveis de TBARS quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 μ M e 89,5 μ M de Ridomil Gold SL®.
- Tabela 22.** Níveis de H₂O₂ quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 μ M e 89,5 μ M de Ridomil Gold SL®.

Tabela 23. Teor de prolina quantificado em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 µM e 89,5 µM de Ridomil Gold SL®.

Tabela 24. Pigmentos fotossintéticos quantificados na parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 µM e 89,5 µM de Ridomil Gold SL®.

Tabela 25. Teor de proteínas solúveis na parte aérea de plantas tratadas com 44,75 µM e 89,5 µM de Ridomil Gold SL®.

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição de meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) utilizado para a manutenção de tecido caloso de *S. nigrum* e no estabelecimento e manutenção das suspensões celulares.

Quadro 2. Composição do gel separador.

Quadro 3. Composição do gel concentrador.

Quadro 4. Composição do gel separador.

Quadro 5. Composição do gel concentrador

Quadro 6. Composição do gel separador.

Quadro 7. Composição do gel concentrador

Quadro 8. Composição do gel separador.

Quadro 9. Composição do gel concentrador.

I. INTRODUÇÃO

1. Pesticidas

1.1. Pesticidas e seu uso corrente na prática agrícola

A produtividade agrícola é, em todo o Mundo, limitada pela exposição das plantas a uma série de agentes patogénicos que diminuem acentuadamente a viabilidade das culturas, podendo em situações mais severas culminar na completa destruição das mesmas. Os pesticidas são compostos químicos utilizados na prevenção, destruição ou controlo de qualquer doença ou praga. Atualmente, a utilização de pesticidas torna-se indispensável na manutenção da produtividade das culturas agrícolas. Os pesticidas podem ser sintéticos ou naturais e na generalidade, são classificados de acordo com as pragas que controlam: os algicidas estão envolvidos no controlo de algas, os insecticidas estão envolvidos no controlo de insectos, os fungicidas estão envolvidos no controlo de fungos, etc (Hussey, 1993; Matthews, 2006). Como já foi referido, a aplicação de níveis adequados de pesticidas é fundamental na manutenção da produtividade das culturas agrícolas, no entanto, a utilização excessiva destes compostos traz uma série de preocupações ambientais que resultam do facto destes compostos se acumularem nos solos, água, ar e consequentemente nos alimentos. Além disso, níveis elevados de pesticidas podem interferir com a fisiologia das plantas resultando numa diminuição do vigor das mesmas.

1.2. Definição e classificação de fungicidas

Os fungicidas são compostos químicos amplamente utilizados no combate a infeções fúngicas. Apesar da utilização corrente destes compostos, uma redução na produtividade agrícola de aproximadamente 35% resulta da infeção das plantas por fungos (García *et al.*, 2003). De acordo com o seu modo de ação, os fungicidas são classificados em fungicidas de contacto e fungicidas sistémicos. Os fungicidas de contacto atuam de modo a prevenir as infeções fúngicas. Eles destroem o fungo logo após a germinação dos esporos, antes do crescimento e penetração do micélio nos tecidos vegetais. Pelo contrário, os fungicidas sistémicos destroem o fungo após o micélio ter penetrado nos tecidos vegetais, restringindo deste modo a sua dispersão (García *et al.*,

2003). Devido à sua ação sistêmica estes fungicidas podem proteger toda a planta, incluindo as partes da planta não diretamente pulverizadas.

1.3. Metalaxil

O metalaxil (N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil)-alalinato de metilo) é um fungicida sistêmico pertencente à classe das fenilamidas, tendo sido inicialmente registrado como pesticida em 1979 pela Ciba-Geigy Corporation. À classe das fenilamidas pertencem ainda outros fungicidas sistêmicos como o benalaxil, furalaxil, oxadixil e ofurace (Roberts & Hutson, 1998; Ware, 2000). O metalaxil é efetivo no tratamento de fungos pertencentes à ordem Peronosporales (como por exemplo: *Phytophthora* spp., *Pseudoperonospora* spp., *Peronospora* spp., *Plasmopara* spp., *Sclerospora* spp., *Phytium* spp., entre outras espécies), que afetam o cultivo de plantas com elevada importância econômica como a batateira (*Solanum tuberosum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.), morangueiro (*Fragaria* spp.), etc, (Ware, 2000). A efetividade do metalaxil resulta da inibição da incorporação de uridina no RNA e na inibição específica da RNA polimerase I (Roberts & Hutson, 1998; Ware, 2000). Estudos em *Phytophthora nicotianae* demonstraram que a síntese de RNA, sobretudo de rRNA, é fortemente inibida após a adição de metalaxil (Wollgiehn *et al.*, 1984). A utilização de combinações mistas de metalaxil com outros fungicidas de contacto, como por exemplo, o mancozebe (pertencente à classe dos ditiocarbamatos), o folpete (pertencente à classe das ftalimidas), entre outros, aumenta o espectro de ação deste composto o que resulta no controlo de um maior número de doenças. Devido ao seu amplo espectro de ação, o metalaxil é registrado para uso na prática agrícola em vários países, nomeadamente em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (Ware, 2000).

A persistência deste fungicida nos solos resulta da sua estabilidade face a amplas faixas de pH, luminosidade e temperatura (Roberts & Hutson, 1998; Ware, 2000). As principais vias de dissipação de metalaxil nos solos são: a absorção pelas plantas, degradação microbiana, fotodecomposição e lixiviação (Ware, 2000). No entanto, quando a aplicação deste fungicida é excessiva, as vias de dissipação anteriormente referidas não são suficientes para a remoção deste composto. Em consequência da acumulação de metalaxil nos solos o crescimento e desenvolvimento das plantas é afetado, de um modo direto (que resulta da ação direta do fungicida no metabolismo das plantas), mas também de um modo indireto (que resulta da ação do fungicida nos microorganismos presentes no solo). Algumas plantas são capazes de absorver,

translocar e metabolizar o metalaxil nos seus tecidos (Ware, 2000). A metabolização do metalaxil envolve reações de oxidação e hidrólise, sendo que os metabolitos resultantes destas reações podem ser conjugados com monómeros de glucose (Ware, 2000). O metalaxil interfere com vários processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Estudos realizados por Fidalgo *et al.* (1991; 1998) demonstraram que a aplicação de Ridomil® MZ 72 WP (mistura de mancozebe e metalaxil) a plantas de batateira (*Solanum tuberosum* L.) afetava negativamente a atividade de enzimas envolvidas em vias metabólicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, nomeadamente, de enzimas envolvidas na redução do azoto inorgânico (nitrato redutase, nitrito redutase) e no processo fotossintético (ribulose-bifosfato carboxilase/oxigenase).

O metalaxil afeta diretamente a estrutura e função das comunidades microbianas. Como tal, a reciclagem dos nutrientes efetuada por estes microorganismos também é afetada. Trabalhos realizados por Sukul (2006), demonstraram que a aplicação de metalaxil nos solos é responsável por um decréscimo da biomassa microbiana, sendo esse decréscimo acompanhado por um declínio acentuado dos níveis de azoto e carbono. O decréscimo no teor de nutrientes resultante da ação do metalaxil sobre os microorganismos pode afetar significativamente o desenvolvimento das plantas.

O metalaxil é um composto altamente solúvel, e vários estudos demonstram a sua tendência de migração para horizontes profundos do solo (especialmente em solos com baixo conteúdo de matéria orgânica), onde pode eventualmente contaminar lençóis freáticos (Ware, 2000).

Assim, a elevada frequência de utilização deste fungicida na prática agrícola, associada com a sua tendência de acumulação nos solos e cursos de água, torna indispensável o desenvolvimento de estratégias de remediação para este composto, de modo a assegurar uma produtividade agrícola sustentável com o menor impacto ambiental possível.

2. Fitorremediação

2.1. Definição, vantagens e limitações

A fitorremediação é uma estratégia de biorremediação que envolve o uso de plantas e microorganismos a elas associados, para a degradação, redução, remoção ou mobilização de poluentes ambientais, orgânicos ou inorgânicos, que estão presentes no solo ou na água (Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006).

Uma das principais vantagens da fitorremediação é o menor custo que esta tecnologia apresenta em relação aos métodos convencionais de remediação (Cunningham & Berti, 1993; Macek *et al.*, 2000; Alkorta & Garbisu, 2001; Peuke & Rennenberg, 2005; Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006). Pelo facto de a fitorremediação ser economicamente viável e de os fundos dispensados para a descontaminação ambiental serem limitados, esta tecnologia tem sido progressivamente adotada em vários países da Europa e nos Estados Unidos (Pilon-Smits, 2005). Para além do baixo custo, a fitorremediação apresenta outras vantagens em relação às outras técnicas de remediação. A fitorremediação engloba métodos não intrusivos que podem ser implementados com mínimo de distúrbio ambiental (Macek *et al.*, 2000; Alkorta & Garbisu, 2001), apresentando elevada probabilidade de aceitação pública (Macek *et al.*, 2000). Para além disso, a utilização de plantas nativas durante o processo de fitorremediação promove a recuperação do ecossistema (Pilon-Smits & Freeman, 2006). Outra vantagem da utilização desta tecnologia prende-se com a sua versatilidade, pois permite a remoção de uma elevada variedade de contaminantes (Macek *et al.*, 2000).

Tal como outros métodos de remediação ambiental, a fitorremediação apresenta algumas desvantagens. Na generalidade, a fitorremediação é um processo mais prolongado que os métodos convencionais, sendo necessário mais tempo para que os níveis de despoluição alcançados sejam satisfatórios (Macek *et al.*, 2000; Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006). Outra limitação da fitorremediação está relacionada com a extensão radicular, pelo que o contaminante deve estar presente nas áreas exploradas pelo sistema radicular das plantas (Pilon-Smits & Freeman, 2006). Assim, as plantas utilizadas neste processo devem possuir um sistema radicular profundo e denso. Por fim, o clima, as condições edáficas e os níveis de contaminantes presentes no solo devem ser adequados ao crescimento das plantas fitorremediadoras (Pilon-Smits & Freeman, 2006).

Apesar das limitações, a fitorremediação apresenta-se como uma tecnologia muito promissora e juntamente com as tecnologias de remediação mecânica pode representar uma mais valia nos projetos de descontaminação ambiental.

2.2. Mecanismos de fitorremediação

A fitorremediação pode envolver diversos mecanismos: fitoextração, fitodegradação, fitoestimulação, fitovolatilização, fitoestabilização e rizofiltração. A fitoextração ou fitoacumulação envolve a remoção dos poluentes orgânicos ou inorgânicos pelas raízes, ocorrendo a translocação

dos mesmos para os tecidos da parte aérea da planta (Fig. 1). As partes aéreas das plantas são posteriormente colhidas e metais de interesse económico, como o níquel e o cobalto, podem ser recuperados. O material vegetal colhido pode ainda ser incinerado, depositado em aterros ou utilizado como biocombustível (Brooks *et al.*, 1998; Peuke & Rennenberg, 2005; Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006). Esta técnica de fitorremediação é particularmente útil na remoção de poluentes não biodegradáveis como os metais e metalóides (Pilon-Smits & Freeman, 2006). A fitodegradação ou fitotransformação, mecanismo que é muito útil sobretudo para poluentes orgânicos, envolve a absorção, compartimentação e degradação parcial ou completa dos poluentes por enzimas produzidas pela planta (Peuke & Rennenberg, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006) (Fig. 1). A fitoestimulação ou rizodegradação envolve igualmente a degradação de poluentes orgânicos, mas na rizosfera, como consequência da estimulação da atividade microbiana (Fig. 1). A libertação de exsudados radiculares (açúcares, aminoácidos, compostos aromáticos, compostos alifáticos e enzimas), estimulam o crescimento de comunidades microbianas específicas que degradam determinadas classes de contaminantes (Macek *et al.*, 2000, Pilon-Smits, 2005). A fitovolatilização envolve a libertação dos poluentes pelas plantas numa forma volátil (Fig. 1). Esta técnica pode ser utilizada para poluentes orgânicos como o tricloroetileno (TCE) e para metais como o mercúrio, o selénio e o arsénio, que após serem absorvidos pelas raízes são convertidos em formas menos tóxicas ou não tóxicas, sendo posteriormente libertados para a atmosfera (Pilon-Smits, 2005). Na fitoestabilização as plantas reduzem a disponibilidade dos contaminantes no solo, através da absorção e acumulação nas raízes ou da precipitação ou complexação na zona radicular (Fig. 1). Os contaminantes são imobilizados e mantidos numa forma estável no solo, sedimentos ou água. Esta técnica pode ser usada para estabilizar solos contaminados, evitando a sua erosão por ação do vento ou da água (Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006).

Na rizofiltração as raízes das plantas são utilizadas na absorção e adsorção de contaminantes (sobretudo metais), da água ou de resíduos aquosos correntes (Macek *et al.*, 2000) (Fig. 1).

Em algumas circunstâncias, a fitorremediação de determinado contaminante recorre a uma combinação dos diferentes processos acima descritos.

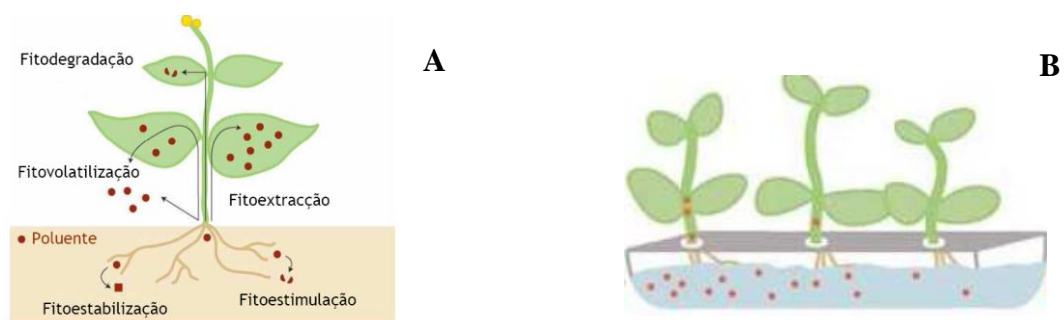


Figura 1 – Representação esquemática das várias tecnologias de fitorremediação. (A) Fitodegradação, fitovolatilização, fitoextracção, fitoestabilização e fitoestimulação. (B) Rizofiltração. Retirado de Pilon-Smits (2005).

2.3. Fitorremediação de contaminantes orgânicos

Devido à complexidade existente nos trabalhos efectuados com compostos orgânicos, a fitorremediação de poluentes orgânicos é menos divulgada que a fitorremediação de metais (Alkorta & Garbisu, 2001). O facto dos compostos orgânicos estarem sujeitos a constantes transformações químicas, dificulta o processo de análise, pelo que a maioria dos trabalhos efectuados nesta temática implica a utilização de metodologias e equipamentos especializados, o que envolve custos elevados. Os estudos realizados na fitorremediação de compostos orgânicos centram-se essencialmente nos seguintes xenobióticos: tricloroetileno (TCE), trinitrotolueno (TNT), gliceroltrinitrato (GTN), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenis policlorinados (PCBs), hidrocarbonetos de petróleo (PHCs) e outros compostos clorinados (Macek *et al.*, 2000; Alkorta & Garbisu, 2001; Peuke & Rennenberg, 2005). A fitorremediação de compostos orgânicos idealmente deveria culminar com a total mineralização dos poluentes orgânicos a compostos não tóxicos como o dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O), nitrato (NO_3^-) e amónia (NH_4^+) (Meagher *et al.*, 2000). No entanto, poucos poluentes orgânicos parecem ser totalmente mineralizados pelas plantas e quando tal ocorre, apenas uma pequena fração do poluente é efetivamente mineralizado (Alkorta & Garbisu, 2001). Dependendo da espécie vegetal, vários mecanismos podem ser empregues na fitorremediação de xenobióticos. Os contaminantes orgânicos podem ser absorvidos diretamente do solo, sendo esta absorção limitada pela disponibilidade do poluente e pelas suas características físico-químicas como: o coeficiente de partição octanol-água, $\log K_{ow}$, a constante de acidez, pK_a , etc. Os compostos orgânicos com maior probabilidade de serem absorvidos pelas raízes das plantas possuem coeficientes de partição octanol-água entre 0,5-3 (Alkorta & Garbisu, 2001; Pilon-Smits, 2005). A eficiência da absorção dos contaminantes orgânicos depende também da taxa de transpiração, e varia com a espécie vegetal, idade, e

propriedades físico-químicas da rizosfera (Alvarez & Illman, 2006). Após absorção, os compostos orgânicos podem ser transportados para outros tecidos vegetais. Estudos com nitrobenzeno e atrazina demonstraram uma disparidade significativa na absorção e subsequente translocação dos compostos orgânicos nas plantas. Diferenças na taxa de transpiração podem ser as responsáveis por estas diferenças, uma vez que vários estudos demonstraram que este fator influencia significativamente a absorção dos contaminantes (Alkorta & Garbisu, 2001). Estudos realizados com *Populus* sp. demonstraram que taxas elevadas de transpiração podem influenciar o gradiente hidráulico e, conseqüentemente, limitar e controlar o transporte de poluentes orgânicos no solo (Schnoor *et al.*, 1995; Burken, 1996). A taxa de transpiração varia drasticamente com a espécie vegetal, área foliar, temperatura, disponibilidade de nutrientes no solo, humidade e deslocação de ar (Alvarez & Illman, 2006). A partição dos poluentes orgânicos varia consideravelmente entre os diferentes órgãos vegetais consoante o composto químico em questão (Alkorta & Garbisu, 2001).

A metabolização dos xenobióticos nos tecidos vegetais envolve na generalidade três processos: ativação, conjugação e compartimentação (Fig. 2) (Macek *et al.*, 2000, Abhilash *et al.*, 2009). A maioria dos compostos orgânicos parece sofrer algum grau de ativação nas células vegetais, antes de serem compartimentados nos vacúolos. Diversos processos como a hidroxilação, peroxidação, sulfoxidação, epoxidação, etc, parecem estar envolvidos neste processo (Abhillash *et al.*, 2009). Sandermann (1992, 1994) demonstrou que as principais enzimas envolvidas na

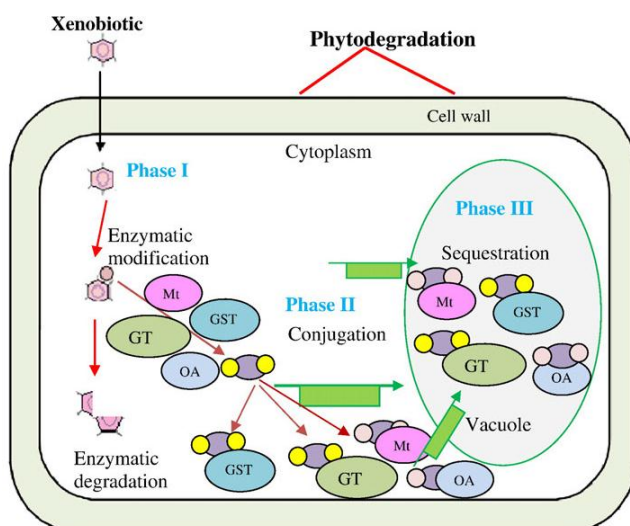


Figura 2 – Processos bioquímicos envolvidos na desintoxicação dos xenobióticos. Retirado de Abhilash *et al.* (2009).

transformação de xenobióticos incluem o citocromo P450, diversas peroxigenases e peroxidases.

Os poluentes orgânicos ou metabolitos correspondentes resultantes do processo de ativação são diretamente conjugados com glutatona, açúcares ou aminoácidos e transportados para o espaço extracelular ou para os vacúolos (Meagher *et al.*, 2000; Abhilash *et al.*, 2009). Os poluentes orgânicos podem ser ainda volatilizados, incluídos em

novas estruturas celulares através do processo de lenhificação ou podem ser ainda parcial ou totalmente mineralizados (Schnoor *et al.*, 1995).

As raízes das plantas libertam exsudados cuja composição química varia consideravelmente consoante as espécies vegetais. Os exsudados radiculares contêm fenóis, açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, proteínas, etc, que podem servir como fonte de carbono e azoto para estimular o crescimento e a atividade metabólica de diversas comunidades bacterianas e fúngicas presentes na rizosfera, que por sua vez são capazes de degradar determinadas classes de poluentes orgânicos (Macek *et al.*, 2000). Os flavonóides e as coumarinas são compostos fundamentais libertados pelas raízes das plantas envolvidos na colonização das bactérias na rizosfera. As bactérias são capazes de degradar estes compostos que servem como uma importante fonte de carbono e azoto para estes organismos. Estes compostos aromáticos são estruturalmente semelhantes aos PCBs, PAHs e PHCs, pelo que o estudo da sua degradação pode fornecer pistas importantes para explorar novos métodos de remediação destes poluentes na rizosfera (Gerhardt *et al.*, 2008). É ainda importante referir que as plantas são responsáveis pelo aumento de oxigénio na rizosfera, que pode ser utilizado pelas bactérias para o seu próprio metabolismo assim como para a oxidação dos poluentes (Campanella *et al.*, 2002). Para além de libertarem compostos orgânicos que suportam o crescimento e atividade dos microorganismos rizosféricos, as plantas libertam também enzimas que degradam os contaminantes orgânicos. Estas enzimas englobam as nitroreduases, nitrilases, lacases e peroxidases. No entanto, a atividade destas enzimas é inibida por elevadas concentrações dos contaminantes, toxinas bacterianas e baixo pH dos solos, pelo que o seu papel no processo geral da fitorremediação é limitado (Schnoor *et al.*, 2005).

2.4. Fitorremediação do metalaxil

Como já foi anteriormente referido, o metalaxil é um potencial contaminante ambiental. Até ao momento, poucos estudos foram desenvolvidos no sentido da fitorremediação deste composto. Wilson *et al.* (2001) estudaram o efeito do metalaxil na produção de biomassa em diferentes espécies vegetais (*Acorus gramineus* Sol., *Canna hybrida* L., *Myriophyllum aquaticum* Verdc. e *Pontederia cordata* L.), tendo aplicado diferentes concentrações do referido composto em meio aquoso. Os resultados deste estudo revelaram que concentrações de metalaxil inferiores a 75 mg L⁻¹, não afectam significativamente a produção da biomassa em todas as espécies vegetais. Verificou-se ainda, que lesões necróticas surgiram nas folhas de praticamente todas as espécies

para concentrações de metalaxil superiores a 25 mg L⁻¹. Num estudo similar, Wilson *et al.* (2000) constataram que *Typha latifolia* reduziu 34% da actividade do metalaxil sete dias após exposição ao referido composto. Teixeira *et al.*, (2011) estudaram o efeito da aplicação de diferentes concentrações de metalaxil na produção de biomassa de *Solanum nigrum* L., tendo verificado que concentrações iguais ou superiores a 12,5 mg L⁻¹ afetavam o crescimento das plantas. Uma maior acumulação de metalaxil foi observada nas partes aéreas das plantas, comparativamente com as raízes. Os resultados obtidos neste estudo, mostram que o metalaxil é responsável pela imposição de stress oxidativo, ocorrendo a ativação dos sistemas de defesa antioxidante enzimático (glutathione-S-transferase) e não enzimático (prolina, glutathione). Os resultados das actividades anteriormente descritas indicam a possibilidade da incorporação destas espécies vegetais em esquemas de fitorremediação para o metalaxil. Apesar de úteis, estes estudos não revelam na íntegra quais os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares subjacentes à tolerância deste composto nas plantas.

3. Stress Oxidativo

3.1. Espécies reactivas de Oxigénio

Uma característica comum de todos os tipos de stress quer sejam bióticos (ferimento, patogéneos) ou abióticos (salinidade, seca, poluição atmosférica, elevadas intensidades luminosas, radiações UV, baixas temperaturas, choque térmico), é o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês, *reactive oxygen species*) e, consequentemente, o stress oxidativo. As ROS são produzidas nos tecidos vegetais durante os processos metabólicos aeróbios como a fotossíntese, a respiração mitocondrial, a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos gordos. Em condições normais de crescimento a produção de ROS é muito baixa não apresentando qualquer tipo de ameaça para as células (Arora *et al.*, 2002; Mittler, 2002). No entanto, em situações de stress a produção de ROS em níveis elevados podem causar dano oxidativo em moléculas orgânicas (DNA, proteínas, hidratos de carbono e lípidos), podendo mesmo causar a morte celular. Assim, o stress oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção e remoção das ROS pelos sistemas de defesa antioxidantes (Fig. 3). Nos últimos anos vários estudos têm demonstrando a importância das ROS como moléculas sinal. As ROS intervêm em diversas vias de sinalização que estão envolvidas na regulação de vários processos

fisiológicos, incluindo a defesa a stresses quer abióticos quer bióticos (Laloi *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008).

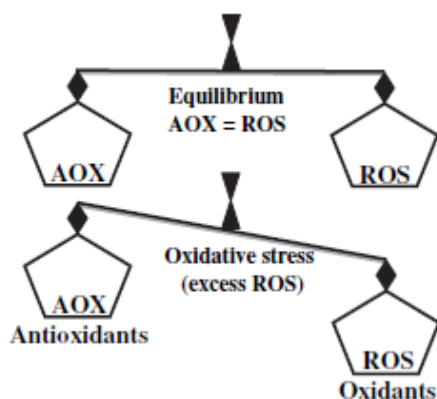


Figura 3 – Equilíbrio entre a produção e remoção das ROS pelo sistema antioxidante. Retirado de Gill & Tuteja (2010).

As principais espécies reactivas de oxigénio são: o singlete de oxigénio (1O_2), o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidróxilo ($HO\cdot$).

O singlete de oxigénio (1O_2) é produzido em condições de elevada intensidade luminosa, quando a clorofila transfere a sua energia de excitação para o oxigénio molecular (O_2). A lipoxigenase também pode estar envolvida na formação do singlete (Laloi *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008). Esta ROS é altamente reativa, possuindo um tempo de vida curto com duração

aproximada de 4 – 100 μs . O 1O_2 pode transferir a sua energia ou reagir com outras moléculas biológicas, formando endoperóxidos ou hidroperóxidos (Vranóva *et al.*, 2002).

O anião superóxido (O_2^-) resulta da redução monovalente do oxigénio molecular (O_2). Esta ROS é moderadamente reativa, possuindo um tempo de vida curto com duração aproximada de 2 – 4 μs . É pouco móvel devido à sua carga sendo incapaz de atravessar membranas biológicas (Breusegem *et al.*, 2001; Vranóva *et al.*, 2002). O anião superóxido pode ser dismutado em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e água (H_2O). A reacção de dismutação pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), sendo que a reacção catalisada enzimaticamente é 10 000 vezes mais rápida que a dismutação espontânea (Vranóva *et al.*, 2002; Gill & Tuteja, 2010; Gupta, 2011). Em soluções aquosas ($pK_a = 4,8$) o anião superóxido pode também ser protonado ocorrendo a formação do seu ácido conjugado: o radical hidroperóxilo ($HO_2\cdot$). O radical hidroperóxilo é capaz de atravessar membranas biológicas. Este radical reage essencialmente com os átomos de hidrogénio presentes nos ácidos gordos polinsaturados e com hidroperóxidos lipídicos iniciando a sua auto-oxidação (Vranóva *et al.*, 2002), contudo tem pouca relevância biológica provavelmente devido à sua baixa concentração ao pH fisiológico. Os principais organelos responsáveis pela produção do anião superóxido nas plantas são os cloroplastos através da reacção de Mehler. No entanto, a produção desta ROS também ocorre no retículo endoplasmático como resultado de reacções de desintoxicação

catalisadas por citocromos (particularmente pelo citocromo P450), no citosol e nos peroxissomas (Rio *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2008; Gill & Tuteja, 2010). O anião superóxido é produzido na matriz dos peroxissomas através da xantina oxidase (XOD) e na membrana destes mesmos organelos em reações dependentes do NAD(P)H (Rio *et al.*, 2002). Aproximadamente 1 - 2% do consumo de oxigénio que se assiste nas células vegetais culmina na produção do anião superóxido (Gill & Tuteja, 2010). Em situações de stress biótico ou abiótico, a produção desta ROS aumenta cerca de 3 vezes (de 240 para 720 $\mu\text{M s}^{-1}$) (Mittler, 2002; Ahmad *et al.*, 2008), podendo atuar como agente oxidante ou redutor. Apesar da sua baixa reatividade, o superóxido é capaz de reagir e danificar alvos intracelulares específicos. Esta ROS inativa enzimas como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase e oxida aminoácidos específicos como a histina, metionina e triptofano (Benov, 2000; Breusegem *et al.*, 2001). Também pode oxidar polifenóis, tióis, catecolaminas, leucoflavinas, tetrahidropterinas e o ascorbato e inativar proteínas que possuem centros ativos de ferro-enxofre ($4\text{Fe} - 4\text{S}$) (Fridovich, 1998). A participação do anião superóxido em reações de redução de quinonas e complexos enzimáticos com os metais de transição Fe^{3+} e Cu^{2+} também já foi descrita em diversas espécies vegetais. Estas reações de redução afetam a atividade das enzimas que contêm estes metais. Iões metálicos presentes na célula e reduzidos pelo superóxido podem catalisar a conversão do H_2O_2 a OH^\cdot pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss (Vranová *et al.*, 2002). Adicionalmente, pode causar a peroxidação dos lípidos das membranas celulares, fragilizando a sua estrutura celular (Breusegem *et al.*, 2001). Podem também ocorrer reações de condensação entre o superóxido e o óxido nítrico levando à produção de peroxinitrito (ONOO^\cdot). O peroxinitrito pode transferir grupos nitrato para resíduos de aminoácidos aromáticos, oxidar tióis e lesionar o DNA. A oxidação de resíduos de aminoácidos aromáticos podem conduzir à produção de radicais fenoxil, sendo estes últimos altamente tóxicos para as células (Temple *et al.*, 2005). Assim, apesar da sua baixa a moderada reatividade química, o superóxido tem capacidade de provocar danos celulares bastantes acentuados.

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma molécula moderadamente reativa, com uma vida relativamente longa (1 ms) e, ao contrário das outras espécies reativas de oxigénio, é capaz de atravessar membranas biológicas podendo difundir-se a alguma distância do seu local de produção (Breusegem *et al.*, 2001; Vranová *et al.*, 2002; Gupta, 2011). Esta ROS é produzida em diferentes compartimentos subcelulares nomeadamente: nos cloroplastos, nos peroxissomas e glioxissomas, nas mitocôndrias e na parede celular. Os peroxissomas são os principais organelos

responsáveis pela produção do H_2O_2 . Os principais processos responsáveis pela produção desta molécula são a fotorrespiração, β -oxidação dos ácidos gordos e catabolismo das purinas. As principais enzimas responsáveis pela produção desta ROS são a MnSOD e as peroxidases dependentes do pH (como a amina oxidase e a oxidase do glicolato) que se localizam na parede celular (Smirnoff, 2005). Esta ROS é capaz de inativar enzimas pela oxidação dos seus grupos tiol. Por exemplo, as enzimas do ciclo de Calvin, a Cu/Zn SOD e a FeSOD, são extremamente sensíveis ao H_2O_2 (Charles & Halliwell, 1980; Vranóva *et al.*, 2002). O H_2O_2 pode também estimular a peroxidação lipídica, nas membranas biológicas, que no caso da membrana plasmática resulta na perda de conteúdos celulares, rápida dessecação e morte celular, enquanto que nas membranas intracelulares pode perturbar a atividade respiratória das mitocôndrias, provocar danos na estrutura dos pigmentos fotossintéticos com a consequente perda na capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1993).

A manutenção adequada dos níveis de H_2O_2 é fundamental para a homeostasia da célula (Gupta, 2011). Em concentrações elevadas o H_2O_2 é produzido e acumula-se nas células gerando stress oxidativo, mas em concentrações baixas atua como molécula sinalizadora, estando envolvida em diversos processos celulares, nomeadamente em processos de aclimação que conferem resistência a diversos fatores de stress biótico e abiótico (Quan *et al.*, 2008; Gupta, 2011). De entre os mecanismos que o H_2O_2 regula destacam-se: ativação de genes que codificam proteínas que fazem parte do sistema antioxidante (por exemplo, CAT, APX, GST e GPX); ativação de proteínas de choque térmico (HSP – *heat shock proteins*); supressão de mecanismos envolvidos na produção de ROS; ativação de genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de peroxissomas, que são fonte de ROS mas também de antioxidantes; lenhificação e processos de fortificação da parede celular em resposta a estímulos externos como o ferimento e o ataque por patógenos (Buchanan *et al.*, 2000; Breusegem *et al.*, 2001). Recentemente, o H_2O_2 é considerado uma molécula versátil envolvida em diversos processos fisiológicos como a senescência, fotorrespiração e fotossíntese, movimento dos estomas, crescimento e desenvolvimento (Quan *et al.*, 2008). Sabe-se ainda que esta molécula estimula a embriogénese somática e é essencial para o gravitropismo das raízes (Breusegem *et al.*, 2001).

O radical hidróxilo ($OH\cdot$) é uma ROS altamente reactiva, com um tempo médio de vida extremamente curto de cerca 1 ns. O H_2O_2 na presença do anião superóxido e de iões metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+) leva à produção do radical hidróxilo ($OH\cdot$) através da reação de Fenton ou Haber-

Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}} O_2 + OH + OH$). Nos sistemas biológicos esta reação é limitada pela disponibilidade dos metais de transição (Smirnoff, 2005). O radical hidróxilo tem grande afinidade com todas as moléculas biológicas, reagindo com estas de forma rápida e indiscriminada, levando a graves danos nos componentes celulares, lesões no DNA, conduzindo a disfunções metabólicas irreparáveis. Em última consequência este radical pode causar a morte celular, uma vez que ainda não foi confirmado nenhum mecanismo enzimático *in vivo* para eliminar esta ROS (Vranóva *et al.*, 2002).

As ROS são na sua globalidade responsáveis por danos oxidativos em importantes moléculas orgânicas como os lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, pigmentos e aminoácidos. Tal evento resulta na perda de função das membranas e organelos, fragmentação da cromatina e de proteínas, o que pode culminar na morte da célula (Ahmad *et al.*, 2008).

Devido ao papel dual das ROS são necessários mecanismos que regulem a sua concentração intracelular, de modo a permitir níveis adequados destas moléculas para a intervenção nas vias de sinalização, e de modo a permitir a remoção do excesso destas moléculas durante as situações de stress (Mittler, 2002).

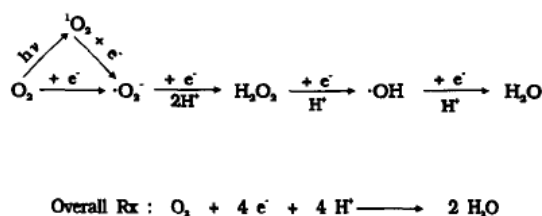


Figura 4 – Reações de redução do oxigénio e formação de ROS. Retirado de Scandalios (1993).

3.2. Sistemas de defesa antioxidante

As plantas desenvolveram eficientes sistemas antioxidantes (enzimático e não enzimático) que lhes permitem modular eficazmente a concentração intracelular de ROS (Arora *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Ahmad *et al.*, 2008).

As principais enzimas do sistema antioxidante enzimático são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX), e a glutathione redutase (GR). O sistema antioxidante não enzimático envolve a intervenção de diversas moléculas de baixa massa

molecular como: a prolina, a glutatona, o ácido ascórbico, os tocoferóis, os carotenóides e os compostos fenólicos (Buchanan *et al.*, 2000).

3.2.1. Sistema antioxidante enzimático

A SOD foi, primeiramente, isolada de sangue de bovino, em 1938, pensando-se que estava relacionada com o armazenamento de cobre. Posteriormente em 1969, McCord e Fridovich, descobriram a sua verdadeira função (referências em Scandalios, 1993).

A SOD catalisa a dismutação do O_2^- a H_2O_2 e O_2 , e está presente em todos os organismos aeróbios, aerotolerantes e em alguns anaeróbios obrigatórios (Fig. 5). Encontra-se praticamente em todos os compartimentos subcelulares, pelo que se assume que a SOD desempenha um papel fundamental na defesa contra o stress oxidativo (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Ahmad *et al.*, 2008;). A remoção do radical superóxido diminui a probabilidade de formação do $HO\cdot$ através da reacção Haber-Weiss (Arora *et al.*, 2002). Nas plantas são identificadas três grupos da SOD que diferem no ião metálico presente no seu centro activo, sendo estes a Cu/ZnSOD, a FeSOD e a MnSOD. Estes grupos apresentam localizações subcelulares específicas (Alscher *et al.*, 2002). A Cu/ZnSOD encontra-se nos cloroplastos, no citosol e nos peroxissomas, a MnSOD aparece na mitocôndria e peroxissomas e a FeSOD, nos plastídios (Bray *et al.*, 2000). Os tipos de SOD podem ser distinguidos entre si pela reacção diferencial ao KCN e ao H_2O_2 . A Cu/ZnSOD é sensível à presença do KCN e do H_2O_2 , enquanto que a MnSOD é resistente a ambos. Por sua vez, a FeSOD é sensível somente à presença de H_2O_2 .

A catalase é uma proteína tetramérica, contendo um grupo heme, e encontra-se em todos os eucariotas aeróbios (Frugoli *et al.* 1996; Scandalios *et al.*, 1997), tendo sido purificada, pela primeira vez, a partir do fígado de boi, por Sunner e Dounce, em 1937 (referência em Scandalios *et al.*, 1997). Embora a baixas concentrações de H_2O_2 possa funcionar como peroxidase, esta enzima catalisa, tipicamente, a conversão do H_2O_2 a H_2O e O_2 , sem consumo de energia celular (Fig. 5) (Frugoli *et al.*, 1996; Scandalios *et al.*, 1997; Smirnov, 2005; Ahmad *et al.*, 2008). Para além do seu papel antioxidante, esta enzima afeta também as vias de sinalização que utilizam o H_2O_2 como molécula sinal (Smirnov, 2005).

A catalase localiza-se preferencialmente ou exclusivamente nos peroxissomas, onde remove o H_2O_2 produzido durante a β -oxidação dos ácidos gordos, fotorrespiração e catabolismo das

purinas (Frugoli *et al.* 1996). Segundo Willekens *et al.*, (1994) as isoenzimas da catalase são classificadas segundo o local de maior expressão. As isoenzimas da catalase pertencentes à classe I são expressas nos órgãos fotossintéticos de um modo dependente da luz. Estas isoenzimas participam na remoção do H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração. À classe II pertencem as isoenzimas abundantes nos tecidos vasculares. As isoenzimas da catalase pertencentes à classe III são muito abundantes em sementes e plantas jovens. Estas isoformas participam na degradação de H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos gordos, no ciclo do glioxilato, nos glioxissomas.

A peroxidase é uma oxirredutase envolvida na degradação do H_2O_2 (Asada, 1997). Esta enzima reduz o H_2O_2 enquanto oxida um determinado substrato (Fig. 5). Dependendo do substrato utilizado podem distinguir-se duas classes de peroxidases: as que usam ascorbato como substrato (peroxidase do ascorbato - APX) e as que oxidam fenóis aromáticos como o guaiacol ou o pirogalol (peroxidase do guaiacol). As peroxidases em geral funcionam em concentrações celulares mais reduzidas do que a catalase, e apresentam uma maior afinidade para o H_2O_2 .

A APX é uma hemoproteína constituída por uma única cadeia peptídica, com a protoporfirina IX, como grupo prostético, cuja principal função é a degradação rápida do H_2O_2 no seu local de formação (Asada, 1997). Para manter as suas funções, esta enzima necessita de um sistema de regeneração do ascorbato e da glutathione na forma reduzida. Este sistema é designado por ciclo ascorbato-glutathione e ocorre praticamente em todos os compartimentos subcelulares (Buchanan *et al.*, 2000). A peroxidase do ascorbato converte o H_2O_2 em água, ocorrendo simultaneamente a oxidação do ascorbato a monodesidroascorbato (MDA). Posteriormente, o MDA pode ser reduzido a ascorbato pela monodesidroascorbato redutase (envolvendo gasto de NADPH), ou pode ser espontaneamente dismutado, ocorrendo a formação de desidroascorbato. Neste caso, ocorre a intervenção da desidroascorbato redutase que regenera o ascorbato a partir da oxidação da glutathione (Buchanan *et al.*, 2000) (Fig. 5).

Até ao momento foram identificadas seis isoenzimas da APX, com diferentes localizações subcelulares: I) duas cloroplastidiais, uma solúvel, no estroma (sAPX), com 27 kDa e outra ligada à membrana dos tilacóides (tAPX); II) uma ligada à membrana dos microsomos (mAPX); III) uma ligada à membrana dos glioxissomas e peroxissomas (pAPX); IV) uma citosólica (cAPX), um homodímero onde cada unidade tem peso molecular próximo da sAPX; V) uma localizada no apoplasto (aAPX) (Asada, 1997; Ahmad *et al.*, 2008). As isoenzimas cloroplastidiais são as que

apresentam maior afinidade para o ascorbato, dado que as citosólicas também podem oxidar fenóis aromáticos (Asada, 1997).

A glutathione redutase (GR), foi primeiramente, detetada em eritrócitos e leveduras, em 1935 (referência em Scandalios, 1997). Em 1951, Mapson e Isherwood em paralelo com Conn e Vennesland (referência em Scandalios), estudaram detalhadamente a função desta enzima que consiste na redução da glutathione disulfido (GSSH) a glutathione (GSH), numa reação dependente do NADPH (Fig. 5). A GR é uma flavoproteína homodimérica que se localiza no estroma dos cloroplastos, mitocôndrias e citosol (Mullineaux & Creissen, 1997; Grill *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2002). Um aumento na atividade desta enzima resulta na acumulação da GSH que está relacionada com um aumento da tolerância das plantas a diversos fatores de stress.

3.2.2. Sistema antioxidante não enzimático

A prolina é sintetizada a partir do ácido glutâmico ou da ornitina. A via de síntese predominante é a do ácido glutâmico, na qual a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase e a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase convertem o glutamato em prolina, através de três reações exergónicas ocorrendo o consumo de uma molécula de ATP e duas moléculas de NADPH (Sharma & Dietz, 2006). Alternativamente, a prolina pode ser sintetizada a partir da ornitina com a intervenção a ornitina- δ -aminotransferase. Embora durante muito tempo a prolina tenha sido considerada como um osmólito compatível, estudos recentes têm evidenciado as múltiplas funções na resposta e adaptação ao stress. Atualmente, a prolina é considerada por vários autores como um membro pertencente ao sistema antioxidante não enzimático, uma vez que testes *in vitro* mostraram que este aminoácido é capaz de eliminar o 1O_2 e o OH^\cdot (Matysik *et al.*, 2002; Kaul *et al.*, 2005; Sharma & Dietz, 2006; Gill & Tuteja, 2010). Em situação de stress por metais pesados a prolina pode ainda funcionar agente quelante dos metais, formando complexos estáveis com os mesmos. Pode atuar ainda como uma molécula osmoprotetora estando envolvida na estabilização de proteínas e na inibição da peroxidação lipídica nas membranas biológicas (Szabados & Savouré, 2009; Gill & Tuteja, 2010).

A glutathione (GSH) é um tripéptido (Glutamato-Cisteína-Glicina) primeiramente detetado nas células vegetais em 1888 (referência em Rennenberg, 2001). Atualmente, é encontrada nas

plantas, animais, fungos e bactérias num intervalo de concentração que varia entre os 0,1 e os 10 mM (Wonisch & Schaur, 2001). Nas plantas a GSH localiza-se praticamente em todos os tecidos vegetais a sua concentração varia de acordo com a idade do tecido e com as condições de crescimento. Por exemplo, os níveis de glutathione são mais elevados na presença de luz do que na obscuridade. A concentração desta molécula também varia entre os diferentes compartimentos celulares. Nas células do mesófilo de *Nicotiana tabacum* L., 76% do conteúdo intracelular da GSH localiza-se nos cloroplastos, 17% nos vacúolos e 7% no citosol (Wonisch & Schaur, 2001). Devido à reatividade do grupo tiol, a GSH e seus compostos relacionados (homoglutathione), estão envolvidos em diversos aspetos do crescimento, desenvolvimento e resposta das plantas a situações adversas (Xiang *et al.*, 2001). A GSH é um antioxidante de elevada importância participando na desintoxicação direta de várias ROS, tais como o 1O_2 , O_2^- e OH $^\cdot$. Esta molécula é um componente fundamental do ciclo ascorbato-glutathione participando na regeneração do ascorbato, através da ação da desidroascorbato redutase (Foyer & Noctor, 2001; Xiang *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2002). A GSH também pode reduzir o desidroascorbato, por um mecanismo não enzimático, a um pH superior a 7 e com uma concentração superior a 1 mM. Esta poderá ser uma via importante, nos cloroplastos, onde o estroma, na presença de luz, apresenta um pH próximo de 8 e onde a concentração de GSH pode superar os 5 mM (Foyer & Halliwell, 1976). Esta pode ainda estabilizar a estrutura das membranas removendo os peróxidos formados, durante a peroxidação lipídica. Para além da sua função antioxidante, a GSH está envolvida noutros processos do metabolismo celular. A GSH é fundamental no armazenamento e transporte de enxofre na forma reduzida entre as folhas e as raízes; participa na desintoxicação de xenobióticos como os herbicidas, através da actuação da glutathione S-transferase; e ainda, é precursora das fitoquelatinas (moléculas envolvidas na desintoxicação de metais pesados), através da acção da fitoquelatina sintase (Buchanan *et al.*, 2000; Grill *et al.*, 2001; Rennenberg, 2001; Xiang *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2002).

O ácido ascórbico (vitamina C ou ascorbato) é o antioxidante mais abundante das células vegetais, encontrando-se num intervalo de concentrações compreendido entre os 10 e os 30 mM. Este antioxidante é sintetizado a partir da D-glucose e encontra-se em todos os compartimentos subcelulares e ainda no apoplasto das células vegetais. A sua concentração é mais elevada nas folhas do que nas raízes, facto que está relacionado, possivelmente, com a sua intervenção na fotossíntese (Smirnoff, 2005; Ahmad *et al.*, 2008). O ascorbato pode eliminar de uma forma

direta o $^1\text{O}_2$, o O_2 e o OH . Este também pode eliminar os radicais livres de oxigênio, de uma forma indireta, participando na regeneração do α -tocoferol, que por sua vez elimina os radicais peroxil e o $^1\text{O}_2$ (Smirnoff, 2005). Uma das propriedades mais importantes do ácido ascórbico é ser oxidado a monodesidroascorbato e a desidroascorbato, pela transferência de um ou dois elétrons, respectivamente, tendo um papel destaque no ciclo da glutatona-ascorbato (Fig. 5) (Delaplace *et al.*, 2011). O ascorbato desempenha um papel importante nos processos fisiológicos das plantas, como no crescimento, na diferenciação celular, no alongamento e divisão celular. Participa em várias reações enzimáticas, como co-fator de várias enzimas. O ascorbato está por exemplo, envolvido na proteção do PSII contra elevada intensidade luminosa, uma vez que serve de co-fator a uma das principais enzimas envolvidas no ciclo das xantofilas, designada por violaxantina de-epoxidase. A violaxantina de-epoxidase catalisa a conversão da violaxantina em zeaxantina que está envolvida na dissipação do excesso de energia, prevenindo a foto-oxidação do PSII (Buchanan *et al.*, 2000; Arora *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2008). No global, o ascorbato possui importantes funções antioxidantes, minimizando os danos provocados pelo stress oxidativo.

Os tocoferóis (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol) são uma família de antioxidantes com diversas funções nas plantas. O α -tocoferol (vitamina E) está presente essencialmente nos plastídios, e devido à sua natureza hidrofóbica localiza-se, exclusivamente, nas membranas celulares. Por sua vez, o γ -tocoferol acumula-se preferencialmente nas sementes. O β -tocoferol e o δ -tocoferol representam as formas menos abundantes (Smirnoff, 2005). O α -tocoferol encontra-se envolvido na desintoxicação das ROS derivadas do processo fotossintético como o $^1\text{O}_2$, e o OH . Além disso, o α -tocoferol encontra-se também envolvido na desintoxicação de peróxidos lipídicos, diminuindo assim a propagação da peroxidação lipídica. O α -tocoferol pode ser oxidado, através da transferência de um elétron, a radical tocoferil. No entanto, pode também reagir com o $^1\text{O}_2$, e através da transferência de dois elétrons, formar um hidroperóxido (Fig. 5). Ambas as reações podem ser reversíveis e, tanto o radical tocoferil como o hidroperóxido, podem ser reduzidos pelo ascorbato a tocoferol. Alguns estudos mostraram que alterações nos níveis dos tocoferóis dependem da exposição das plantas a fatores de stress, estando geralmente um aumento nos níveis destas moléculas associado a um aumento da tolerância das plantas ao stress (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006; Munne-Bosch *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008).

4. *Solanum nigrum* L., origem e propriedades

Solanum nigrum L. é uma planta com distribuição cosmopolita pertencente à família Solanaceae. A esta família pertencem ainda outras plantas de elevada importância económica como a batateira (*Solanum tuberosum* L.), o tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.), a beringela (*Solanum melongena* L.), o pimenteiro (*Capsicum* sp.), as petúnias (*Petunia* spp.) e o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Edmonds & Chweya, 1997).

Solanum nigrum L. é uma planta anual ou bianual que pode atingir cerca de setenta centímetros de altura. O seu caule pode ser ereto ou prostrado, sendo recoberto por pêlos multicelulares, que podem ou não ser glandulares. As folhas são ovais ou elípticas, com margens sinuadas ou sinuado-dentadas. Possui inflorescências simples, e as suas flores são bissexuadas, com simetria regular exibindo uma coloração branca ou levemente violácea. Os seus frutos são bagas globulosas com seis a dez milímetros de diâmetro, de cor variada, sendo geralmente negros na maturação e as suas sementes são numerosas exibindo uma coloração castanha (Akubugwo *et al.*, 2007; Edmonds & Chweya, 1997) (Fig. 6).

A origem exata de *Solanum nigrum* é desconhecida, no entanto, considera-se que esta planta seja nativa da Europa e Ásia (Edmonds & Chweya, 1997). Esta planta é utilizada para fins medicinais, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-cancerígenas dos extratos dos seus frutos (Akubugwo *et al.*, 2007). As folhas e as bagas desta planta são ricas em proteínas, aminoácidos (metionina), fibras, hidratos de carbono, vitaminas (A, C), minerais (cálcio, ferro, fósforo, magnésio) e carotenos, pelo que é incluída na dieta alimentar, especialmente na África e Ásia (Akubugwo *et al.*, 2007; Edmonds & Chweya, 1997).



Figura 6 – *Solanum nigrum* L. Retirado de Edmonds & Chweya (1997).

4.1. *Solanum nigrum* L. em estudos de fitorremediação de contaminantes orgânicos

Pesquisas recentes revelam *Solanum nigrum* L. como uma espécie potencialmente útil na remediação de contaminantes ambientais. A maioria dos trabalhos realizados com esta planta centram-se na sua capacidade de remediação de contaminantes inorgânicos, especialmente do cádmio e zinco (Wei *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Pereira *et al.* (2006), demonstram que *S. nigrum* é capaz de acumular nos seus tecidos (radiculares, caulinares e foliares) todos os isómeros (α -, β -, δ -) do pesticida hexaclorociclohexano (HCH). Já Kucerová *et al.* (2000) recorrendo a culturas de raízes capiliformes, demonstrou que estas estruturas são capazes de degradar aproximadamente vinte e dois congêneres de bifenis policlorinados (PCBs). Como já foi referido anteriormente, esta planta está envolvida na acumulação de metalaxil (Teixeira *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem a possibilidade da introdução desta planta em protocolos de fitorremediação de contaminantes orgânicos, pelo que é necessário desenvolver mais estudos para que tal objectivo seja alcançado.

5. Culturas *in vitro*

5.1. Utilização de culturas *in vitro* em estudos de fitorremediação

A utilização de culturas *in vitro* como modelo experimental pode ser vantajosa em estudos de fitorremediação, uma vez que as culturas *in vitro* contornam algumas das limitações impostas pelo uso de plantas intactas. Culturas de tecido caloso, células em suspensão e raízes capiliformes são frequentemente utilizados em estudos de fitorremediação (Doran, 2009). Uma vez estabelecidas, as culturas *in vitro* podem ser mantidas indefinidamente pelo que o tempo dispensado nos trabalhos laboratoriais é significativamente reduzido (Doran, 2009). As culturas de tecidos são uma fonte de material relativamente homogêneo, que pode ser facilmente manipulado em ambiente controlado. A composição do meio nutritivo pode ser facilmente alterada no que diz respeito ao tipo e quantidade de nutrientes. Durante muitos anos, o metabolismo dos xenobióticos foi atribuído somente aos microorganismos associados ao sistema radicular das plantas. Estudos *in vitro* mostraram que culturas de células em suspensão

apresentavam capacidade de metabolizar uma série de xenobióticos mesmo na ausência de microorganismos. Estes estudos permitiram analisar individualmente as respostas a nível celular e molecular fornecido pelas células vegetais sem interferência dos microorganismos (Doran, 2009). As culturas de tecidos permitem também uma absorção uniforme dos contaminantes. Para além disso, nestes sistemas experimentais a absorção dos poluentes é facilitada devido à ausência de ceras, cutículas, epidermes, endodermes, etc (Doran, 2009).

Apesar de todas as vantagens referidas anteriormente, as culturas de tecidos não são aplicáveis em campo. A manutenção destes sistemas requer condições estéreis, o que é impraticável *in situ* (Doran, 2009). Por outro lado, a disponibilidade dos contaminantes, os processos de absorção e o metabolismo dos xenobióticos pode ser substancialmente diferente no sistema *in vitro* e *in vivo*, pelo que em estudos de fitorremediação deve ser avaliado o grau de correlação existente entre a resposta de plantas crescidas em campo e a resposta fornecida pelas culturas de tecidos. Caso o grau de correlação seja elevado, é possível o uso do sistema *in vitro* como sistema experimental o que pelos motivos referidos anteriormente se revelaria de grande utilidade prática.

5.2. Culturas *in vitro* de *Solanum nigrum* L. e sua utilização em estudos de fitorremediação

Trabalhos realizados por Hassanein & Soltan (2000) demonstram a elevada capacidade regenerativa de *S. nigrum* em diferentes condições de cultura, característica que permite utilizar esta planta como um modelo experimental em culturas de tecidos. As culturas *in vitro* têm sido utilizadas com sucesso em estudos de fitorremediação relacionados com esta planta. A utilização de culturas de tecido caloso e de raízes capiliformes em alternativa às plantas intactas está documentada em alguns trabalhos experimentais (Doran, 2009). Culturas de raízes capiliformes de *S. nigrum* foram utilizadas por diversos investigadores em estudos sobre a acumulação de cádmio (Macek *et al.*, 1994), zinco (Subroto *et al.*, 2009), e também como já foi anteriormente referido, no estudo sobre a degradação de PCBs (Kucerová *et al.*, 2000).

6. Objectivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do metalaxil no metabolismo das células em suspensão de *Solanum nigrum* L., de modo a caracterizar as respostas que decorrem a nível celular, ao stress imposto pela presença do fungicida no meio de cultura. Parâmetros fisiológicos

relacionados com o crescimento e viabilidade celular, acumulação de prolina, níveis de H_2O_2 e avaliação do dano membranar foram avaliados. Outro objetivo do trabalho visou conhecer o efeito do metalaxil no teor de proteínas solúveis e no padrão eletroforético dos polipeptídeos através da técnica de SDS-PAGE. A atividade total e padrão das várias formas das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX foram também determinados. Recorrendo-se à técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa, avaliou-se a capacidade das células em suspensão de acumularem e/ou degradarem o metalaxil. Este fungicida foi utilizado como objecto de estudo por ser muito utilizado na prática agrícola para prevenir e/ou combater diversas estirpes fúngicas e por ser acumulável nos solos e cursos de água. Além disso, existe uma acentuada tendência para que os fungicidas sejam usados excessivamente provocando elevados níveis de poluição, com efeitos negativos no ambiente e saúde pública.

Como até ao momento existem poucos trabalhos sobre as possíveis estratégias de fitorremediação do metalaxil, entendeu-se importante avaliar as respostas de *S. nigrum*, recorrendo ao modelo *in vitro*, de modo a obter conhecimento sobre o potencial uso de *S. nigrum* na remediação do fungicida metalaxil.

Com o objetivo de avaliar o grau de correlação existente entre a resposta das células em suspensão – sistema *in vitro* – ao tratamento com o fungicida e a das plantas crescidas em soluções hidropónicas – situação *in vivo* – foram feitos estudos semelhantes aos realizados nas células em suspensão.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de células em suspensão de *Solanum nigrum* L.

1.1. Indução e estabelecimento da cultura de células em suspensão de *S. nigrum*

Para a indução e estabelecimento da cultura das células em suspensão foram utilizadas porções de tecido caloso estabelecido de *Solanum nigrum* L.. Este tecido apresentava cor verde amarelada e consistência friável.

A cultura estabelecida de tecido caloso já disponível em laboratório e utilizada neste trabalho foi obtida a partir de fragmentos foliares de plantas jovens de *S. nigrum*. O tecido caloso foi mantido em frascos de cultura com 100 mL de meio nutritivo desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), cuja composição se encontra descrita no quadro 1. Este meio de cultura é suplementado com os seguintes reguladores de crescimento: uma auxina, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a 2 mg/L e, uma citocinina, a benzilaminopurina (BA), a 0,5 mg/L. O pH do meio foi ajustado para 5,7 com KOH 1M, e como agente solidificante é utilizado agar na concentração de 0,63% (p/v). O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C, durante 28 minutos. Em intervalos de tempo correspondentes a 28-30 dias o tecido foi subcultivado para meio fresco. É de referir que nas situações subsequentes, o tempo de autoclavagem foi ajustado consoante o volume de meio a ser esterilizado.

A cultura de tecido caloso foi mantida em estufa de cultura, a uma temperatura constante de 24°C e num regime fotoperiódico de 16 horas de luz / 8 horas de obscuridade, fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo “day light”, com uma densidade de fluxo fotónico de 35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Com o objectivo de induzir a cultura de células em suspensão pequenas porções de tecido caloso friável foram transferidas, em condições assépticas, para meio líquido MS que possuía a mesma composição básica descrita anteriormente para a cultura de tecido caloso. Foram inclusivamente utilizados os mesmos reguladores de crescimento, nas mesmas concentrações. O pH dos meios foi igualmente ajustado para 5,7 com KOH 1M e a autoclavagem foi feita em condições idênticas, com o tempo de autoclavagem ajustado em função do volume de meio a esterilizar. As porções de tecido caloso utilizadas para o estabelecimento das células em suspensão foram mantidas em matrizes de 250 mL com 40 mL de meio nutritivo em agitação contínua (120 rpm), à temperatura de 25°C em estufa de cultura e em regime de obscuridade.

Compostos inorgânicos	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	439
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Fe-EDTA	40
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025
KI	0,83
Compostos orgânicos	mg/L
Mio-Inositol	100
Glicina	2
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina-HCL	0,5
Tiamina-HCL	0,1
Sacarose	30000

Quadro 1 – Composição do meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) utilizado para a manutenção de tecido caloso de *S. nigrum* e no estabelecimento e manutenção das suspensões celulares.

Nesta fase e com o objetivo de serem detectadas possíveis infecções na cultura, foram recolhidas alíquotas de 1 mL da cultura na câmara de fluxo laminar, em condições estéreis. As amostras recolhidas foram observadas num microscópio de campo claro (Nikon type 104 – Fotomicroscópio ponte óptico 620525) numa ampliação de 10X e o registo das imagens foi efetuado a partir de uma Nikon Digital Camera DXM1200F e do software Nikon ACT1.

Após 13 dias as células em suspensão foram subcultivadas para meio fresco e depois de apenas uma subcultura foi possível obter a cultura de células em suspensão de *S. nigrum* que foi utilizada neste trabalho.

Com a finalidade de se conhecer o volume de inóculo ideal a ser subcultivado em meio fresco, ensaiaram-se quatro situações em que se fez variar esse volume. Testaram-se os volumes de 5, 10, 15 e 20 mL das culturas de células em suspensão que foram transferidos para diferentes matrizes, contendo cada um 40 mL de meio líquido. A transferência do material em cultura foi efetuada numa câmara de fluxo laminar, recorrendo-se para tal a um pipetador automático (Pipet

Aid XP, Drummond Scientific Company) previamente desinfetado com etanol 70% e a pipetas serológicas estéreis de 10 mL. Observações a nível macroscópico mostraram que o volume mais adequado que deveria ser utilizado para a subcultura das células em suspensão era de 20 mL, o que corresponde a uma diluição de 1:3. Nesta situação a cultura apresentava-se homogénea, com cor creme e uma densidade celular bastante razoável.

1.2. Avaliação da cinética de crescimento

A fim de se conhecer a cinética de crescimento das células em suspensão foram recolhidas alíquotas de 5 mL da cultura, recorrendo-se para tal a 3 matrizes aleatoriamente selecionados de um total de 8. Procedeu-se à determinação do peso fresco e do peso seco das células em suspensão logo após o processo de subcultivo (0 h), e posteriormente às 48 (2 dias), 96 (4 dias), 168 (7 dias), 216 (9 dias), 264 (11 dias) e 312 h (13 dias). Com os dados obtidos foi estabelecida a curva de crescimento da cultura de células em suspensão de *S. nigrum*.

- Determinação do peso fresco

Para a determinação do peso fresco, foram utilizados filtros com poro 5,0 µm (Sartorius Stedium Biotech gmbH) previamente humedecidos com 500 µL de água desionizada, sendo registado o seu peso. As amostras recolhidas foram filtradas num sistema de vácuo (Siehe Unterseite Pumpe) e fez-se novamente o registo do peso (massa das células recolhidas + filtro).

O peso fresco das células recolhidas foi calculado pela subtração do peso final ao peso inicial dos filtros.

- Determinação do peso seco

Na determinação do peso seco, os filtros anteriormente utilizados na determinação do peso fresco, foram colocados numa estufa a 60°C. O peso das amostras foi registado após ter estabilizado.

2. Estudos na cultura de células em suspensão de *Solanum nigrum* L.

Neste trabalho procedeu-se ao estudo do efeito do fungicida Ridomil Gold SL® quando adicionado ao meio de manutenção da cultura de células em suspensão de *S. nigrum*. Este fungicida é

correntemente utilizado na prática agrícola, sendo efectivo no tratamento de fungos pertencentes à ordem Peronosporales e possui tendência de acumulação nos solos e cursos de água (Ware, 2000).

- Características do fungicida

- Ridomil Gold SL® (Syngenta, Portugal): acção sistémica, actua como preventivo e curativo.
- Concentração/Composição: 48% de Mefenoxam, equivalente a 465 g/L de Metalaxil-L.
- Tipo de formulação: concentrado solúvel

O Ridomil Gold SL® é um fungicida sistémico pertencente à classe das fenilamidas, tendo sido inicialmente registado como pesticida pela Ciba-Geigy Corporation em 1979.

2.1. Preparação de meios de cultura suplementados com Ridomil Gold SL®

Depois de se ter conseguido estabelecer a cultura de células em suspensão de *S. nigrum* e face à resposta de crescimento demonstrada, as células em suspensão foram transferidas para meios de cultura suplementados com o fungicida. O fungicida foi adicionado por filtração, aos meios de cultura previamente esterilizados, sendo utilizados para tal filtros com 0,45 µm de poro (Orange Scientific, Gyro disc CA). As concentrações finais do fungicida foram de 71,60 µM (20 mg/L) e 143,20 µM (40 mg/L), sendo também incluída a situação controlo. As concentrações de Ridomil® Gold SL escolhidas para a realização deste trabalho tiveram como base estudos previamente efetuados em plantas pertencentes ao género *Solanum* (em *Solanum tuberosum* L., concretamente), que foram conduzidos no sentido de serem avaliadas alterações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais desta espécie vegetal face à aplicação do Ridomil® MZ 72 (Fidalgo, 1995), que é um produto análogo ao fungicida em estudo. No presente trabalho interessava serem utilizadas concentrações do fungicida que por um lado permitissem avaliar a resposta diferencial das células em suspensão quando propagadas nas diferentes concentrações do agroquímico e que por outro lado, permitissem o crescimento das células de modo a existir biomassa suficiente para executar os diversos ensaios experimentais previstos. Face aos resultados obtidos as concentrações de 71,60 e 143,20 µM demonstraram ser razoáveis para o cumprimento destes parâmetros.

De modo a detetar possíveis infeções a nível macroscópico, os meios de cultura eram preparados com antecedência de cerca de 5 dias relativamente ao dia destinado à subcultura das células em suspensão.

2.2. Avaliação da cinética de crescimento de células em suspensão propagadas em meios de cultura suplementados com Ridomil® Gold SL

Com a finalidade de conhecer o efeito do Ridomil no crescimento das células em suspensão foi estabelecida a curva de crescimento da cultura na ausência do fungicida e na presença de 71,60 e 143,20 μM do mesmo. A determinação do peso fresco e do peso seco foi efectuada logo após o processo de subcultivo (0h), e posteriormente às 48 (2 dias), 96 (4 dias), 168 (7 dias), 216 (9 dias), 264 (11 dias) e 312 h (13 dias). Para cada tempo de colheita foram recolhidas alíquotas de 5 mL de cultura, recorrendo-se para tal a 2 matrizes cujas células não haviam sido expostas ao fungicida (situação controlo) e a 6 matrizes, das quais 3 possuíam células expostas a 71,60 μM e outros 3 possuíam células expostas à concentração mais elevada do fungicida (143,20 μM).

- Determinação do peso fresco e do peso seco

O peso fresco e o peso seco foi determinado conforme referido anteriormente, na página em 1.2.

2.3. Análise da viabilidade celular

Para a análise da viabilidade celular recorreu-se ao método de coloração por azul de tripano. O azul de tripano é um corante vital frequentemente utilizado para a identificação de células não viáveis em culturas de células em suspensão.

Neste trabalho a avaliação da viabilidade celular foi realizada paralelamente à avaliação da cinética de crescimento, pretendendo-se no fundo saber se a taxa de sobrevivência das células em suspensão era compatível com curva de crescimento que estava a ser estabelecida. Às 168 (7 dias) e 312 h (13 dias) foram recolhidas alíquotas para a avaliação da viabilidade celular dos mesmos matrizes onde foram recolhidas alíquotas para a avaliação da cinética de crescimento. Para a avaliação da viabilidade celular foram recolhidas 3 alíquotas (de 5 ml cada) de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil. As amostras

foram recolhidas em câmara de fluxo laminar e de modo a assegurar homogeneidade da cultura os matrizes a partir dos quais foram recolhidas as amostras foram suavemente agitados. O azul de tripano foi adicionado às células em suspensão numa proporção de 1:1 (1000 µl de células em suspensão + 1000 µl de corante) (Gratão *et al.*, 2008). Após a adição do azul de tripano as amostras foram vigorosamente agitadas e após 10 minutos procedeu-se a observações ao microscópio. A contagem do número de células decorreu na câmara de Neubauer (Fig. 7A) previamente desinfectada com etanol a 70%. Utilizando pipetas de Pasteur de vidro estéreis, as amostras foram depositadas em um dos campos laterais ao campo central até que todos os canais interligados estivessem completos.

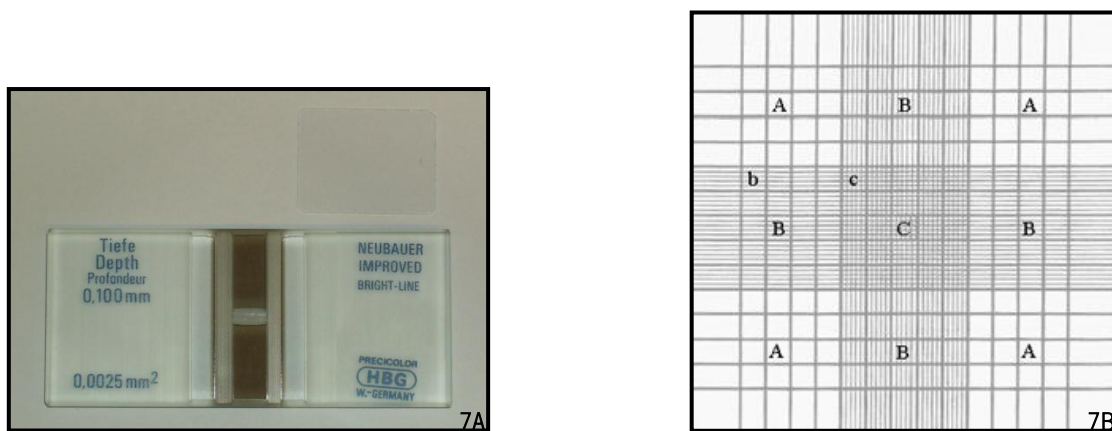


Fig. 7A-B Câmara de Neubauer. **A** - Representação fotográfica da câmara de Neubauer. **B** - Imagem ilustrativa das divisões da câmara de Neubauer nas quais se procedeu à contagem das células.

A contagem do número de células foi efetuada nos quadrantes A (Fig. 7B). A escolha do tipo de quadrantes utilizados para a contagem das células baseia-se no tamanho das mesmas. Como o tamanho das células vegetais varia entre os 10 e 100 µm, os quadrantes A demonstram ser os ideais para a sua contagem. Rastreios iniciais (3 no total) mostraram que preparações observadas para as diferentes situações experimentais apresentavam um número de células compreendido entre 50 e 200 pelo que não houve necessidade de diluir as amostras. As células foram observadas num microscópio de campo claro (Nikon type 104 – Fotomicroscópio ponte óptico 620525) numa ampliação de 10X e o registo das imagens foi efectuado a partir de uma Nikon Digital Camera DXM1200F e do software Nikon ACT1. A contagem das células foi realizada em preparações que apresentavam aproximadamente 90% de células isoladas, isto para minimizar a percentagem de erro efectuada na própria contagem. No entanto, para efeitos ilustrativos foram recolhidas imagens onde predominam agregados celulares. É de salientar que

preparações onde foram encontrados tais agregados não foram utilizadas para a contagem das células.

2.4. Processamento das células em suspensão

Células em suspensão recolhidas em diferentes fases do ciclo de crescimento foram filtradas e lavadas com água desionizada estéril em sistema de vácuo (Siehe Unterseite Pumpe). Posteriormente foram efectuadas alíquotas com determinada massa e armazenadas a -80°C para futuras análises. Tal armazenamento não era executado, quando para determinada análise era requerido material vegetal fresco.

3. Determinações bioquímicas

Neste trabalho foram realizadas determinações bioquímicas indicadoras de stress, respectivamente: avaliação do dano membranal através da quantificação de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), quantificação espectrofotométrica do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e determinação do teor de prolina. As células em suspensão utilizadas nestas quantificações foram recolhidas no momento do subcultivo (0 h) e 5 h após o processo de subcultivo e também durante e no final da fase exponencial de crescimento, exactamente ao 7º e 14º dias.

3.1. Avaliação do dano membranal

No presente estudo, a determinação da peroxidação dos lípidos das membranas foi realizada de acordo com o método descrito por Heath & Packer (1968). Para cada situação experimental foram utilizadas amostras de células em suspensão previamente armazenadas a -80°C. Cada amostra cujo peso correspondia a cerca de 0,5 g foi homogeneizada em 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), sendo posteriormente o homogeneizado centrifugado a 10 000 g (5 min, Beckman Optima™ TL Ultracentrifuge). A alíquotas de 250 µL de sobrenadante foram adicionados 1000 µL da mistura de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Para cada situação experimental foram preparadas 5 tubos. Além disso, foram preparados 2 tubos branco (250 µL de TCA 0,1% (p/v) e 1000 µL da mistura referida). Seguidamente, todos

os tubos foram incubados a 95°C durante 30 min (Dry block heating thermostat Bio TDB-100). Após a incubação os tubos foram todos arrefecidos em gelo durante 10 min de modo a parar a reacção. De seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 10 000 g (15 min, Eppendorf 5415C). Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos que foram mantidos na obscuridade até à leitura da absorvância. A absorvância foi lida a 532 e 600 nm em espectrofotómetro Jasco V-530 UV/Vis e em software Spectra Manager. Os valores obtidos a 600 nm foram subtraídos aos lidos a 532 nm para eliminar efeitos devidos a turbidez não específica. A concentração de TBARS foi expressa em nmol/g peso fresco, tendo sido considerado o coeficiente de extinção milimolar de 155 mM⁻¹.cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968).

3.2. Quantificação do peróxido de hidrogénio

Primeiramente, e em semelhança com as restantes determinações bioquímicas realizadas neste estudo, amostras de células em suspensão armazenadas a -80°C foram processadas para a determinação do peróxido de hidrogénio. No entanto, o processo de congelamento demonstrou afectar os valores de peróxido de hidrogénio quantificado, e por isso, após se ter detetado esta incompatibilidade o congelamento das amostras não voltou a ser considerado. Assim, nesta quantificação foi utilizado material vegetal fresco, pelo que amostras de células em suspensão foram filtradas para cada intervalo de tempo considerado e imediatamente processadas. Cada amostra cujo peso correspondia a cerca de 0,5 g foi homogeneizada num almofariz com areia de quartzo e 1200 µL de tampão fosfato (50 mM; pH 6,5), sendo posteriormente o homogeneizado centrifugado a 6 000 g (25 min, Eppendorf 5415C). A aliquotas de 1000 µL de sobrenadante foram adicionados 1000 µL da mistura de sulfato de titânio 0,1% (p/v) em 20% de ácido sulfúrico, mantendo-se a mistura na obscuridade. O branco foi preparado pela junção de 1000 µL de tampão fosfato (50 mM; pH 6,5) com a mistura de sulfato de titânio 0,1% (p/v) em 20% de ácido sulfúrico. De seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 6 000 g (15 min, Eppendorf 5415C). Os tubos foram mantidos na obscuridade até à leitura da absorvância que foi efectuada a 410 nm. A concentração do peróxido de hidrogénio foi calculada e expressa em nmol/g peso fresco, utilizando-se o coeficiente de extinção micromolar do H₂O₂ (0,28 µM⁻¹.cm⁻¹; Chen *et al.*, 2006).

3.3. Quantificação do teor de prolina livre

Num almofariz contendo areia de quartzo, homogeneizou-se cerca de 0,250 g de células em suspensão previamente mantidas a -80°C em 2 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 720 g (10 min, Sigma 3-10) e a uma alíquota de 2 mL de sobrenadante foi adicionado igual volume de ácido acético glacial e ninidrina ácida. A mistura foi incubada em banho-maria a 100°C durante 1 h. Ao fim desse intervalo de tempo procedeu-se ao arrefecimento dos tubos em gelo durante 10 min, de modo a parar a reação. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de tolueno a cada tubo e agitou-se vigorosamente de forma a permitir uma emulsão fina. Após estabilização e separação completa das fases, recolheu-se a fase superior de cor rosa avermelhada com uma pipeta Pasteur de vidro para novos tubos. Após atingir a temperatura ambiente a absorvância foi lida a 520 nm, sendo utilizado como branco o tolueno. O conteúdo de prolina livre foi calculado a partir de uma recta-padrão executada segundo o processo descrito anteriormente, recorrendo-se para tal a soluções de prolina de concentração conhecida. O conteúdo de prolina livre foi expresso em $\mu\text{g/g}$ peso fresco.

3.4. Análise da acumulação de polipeptídeos por SDS-PAGE

- Extração e quantificação

Para fazer a extração das proteínas solúveis, amostras de células em suspensão (cuja massa era cerca de 2 g) foram homogeneizadas em 1,2 mL de tampão Tris-HCL 0,06 M (pH 6,8) com inibidor de proteases [1,4 pastilhas/10 mL – Complete™, Mini, EDTA-free (Boehringer Mannheim)], PVPP insolúvel 1% (p/v) e areia de quartzo. O processo de homogeneização decorreu num almofariz previamente arrefecido e em banho de gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 4 000 g, durante 10 minutos a 4°C (Beckman Optima™ TL Ultracentrifuge). Posteriormente foram recolhidas alíquotas para a quantificação de proteínas solúveis (Bradford, 1976).

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (1976), no qual se faz reagir, durante 10 min, 990 μL de *Coomassie Plus™ Protein Assay* com 33 μL de extrato proteico, em diluição apropriada, à temperatura ambiente. A quantificação espectrofotométrica efectuou-se a 595 nm (UV/Vis Shimadzu UV-240), usando uma recta padrão obtida com soluções de BSA de concentração conhecida.

- Determinação do padrão das proteínas solúveis

A fim de serem detetadas possíveis alterações no padrão electroforético das proteínas solúveis, recorreu-se ao sistema de eletroforese descontínuo de Laemmli (1970) usando-se para tal um gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), (gel separador 12,5% e gel concentrador 5%). A eletroforese foi realizada em géis verticais, de 1,5 mm de espessura, tendo sido utilizada a unidade SE 260 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 12,5% (gel separador) e espessura de 1,5 mm, na unidade SE 260, foram os seguintes (Quadro 2):

Água desionizada	4650 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	3800 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	6250 µL
SDS 10% (p/v)	150 µL
APS 10% (p/v)	150 µL
TEMED	6 µL
Volume final	15000 µL

Quadro 2 – Composição do gel separador.

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 5% (gel concentrador) e espessura de 1,5 mm, na mesma unidade (SE 260), foram os seguintes (Quadro 3):

Água desionizada	2200 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	1000 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	667 µL
SDS 10% (p/v)	40 µL
APS 10 % (p/v)	40 µL
TEMED	4 µL
Volume final	3951 µL

Quadro 3 – Composição do gel concentrador.

Os extratos proteicos obtidos, foram combinados com tampão de amostra desnaturante 4X (Tris-HCL 0,25M pH 6,8, SDS 8% (p/v), β -mercaptoetanol 20% (v/v) e glicerol 40 %), fervidos a 100°C, durante 5 min, e mantidos a -20°C até futura utilização. Imediatamente antes de serem aplicadas nos géis, as amostras eram novamente fervidas durante 5 min a 100°C e centrifugadas a 6 000g, durante 2 min. Em cada poço do gel foram aplicadas 10 μ g de proteínas e paralelamente foi aplicada uma mistura de padrões de massas moleculares conhecidas (Prestained SDS-Standards, Broad Range, Bio-Rad). Como tampão de eletroforese utilizou-se Tris-HCL 25 mM e glicina 192 mM (pH 8,3), com SDS 0,1% (p/v). As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente, tendo sido utilizada no gel concentrador a intensidade da corrente de 15 mA/gel, sendo posteriormente alterada para 20 mA/gel quando as amostras atingiram o gel separador.

A fixação dos géis foi feita durante 30 min numa solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). O gel foi incubado na solução de coloração [(*Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,125% (p/v), metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)], durante 30 min. Ao fim deste tempo a solução de coloração foi trocada por uma solução descolorante (metanol 5% (v/v), ácido acético 7,5% (v/v) e glicerol 2%). O gel foi mantido em agitação ON até se obter o contraste desejado. É de referir que todos os passos descritos anteriormente (fixação, coloração e descoloração), decorreram à temperatura ambiente, na obscuridade e com agitação.

Após o processo de descoloração foram visualizadas bandas azuis num fundo acromático. Os géis foram guardados em água desionizada a 4°C.

3.5. Extracção de enzimas do sistema antioxidante enzimático

- Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

As amostras de células em suspensão foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,3), com glicerol 8%, inibidor de proteases [1,4 pastilhas/10 mL – Complete™, Mini, EDTA-free (Boehringer Mannheim)], PMSF 1 mM, EDTA Titriplex **III** (sal dissódico) 1mM, PVPP 2% (p/v), e areia de quartzo. O processo de homogeneização decorreu num almofariz previamente arrefecido e em banho de gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 26 000 g, durante 18 minutos a 4°C (Beckman Optima™ TL Ultracentrifuge). Posteriormente foram recolhidas alíquotas para a quantificação de proteínas (Bradford, 1976) e para aplicação em gel, tendo sido adicionada a estas últimas azida sódica (inibidor de peroxidases), para a concentração

final de 10 μ M, após o que foram combinadas com glicerol para uma concentração final de 40% (v/v) e armazenadas a -80°C. Aliquotas foram utilizadas de imediato para a quantificação espectrofotométrica da atividade.

- Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas em condições semelhantes às descritas para a enzima SOD. Depois da centrifugação, foram recolhidas aliquotas para a quantificação de proteínas (Bradford, 1976) e para aplicação em gel, tendo sido adicionada a estas últimas DTT para a concentração final de 10 mM (Anderson *et al.*, 1995), após o que foram combinadas com glicerol para uma concentração final de 40% (v/v) e armazenadas a -80°C ou utilizadas de imediato para a quantificação espectrofotométrica da actividade.

- Ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas em condições idênticas às descritas anteriormente para a enzima SOD. Após a centrifugação, foram separadas aliquotas para a quantificação de proteínas (Bradford, 1976) e para a aplicação em gel e/ou para a quantificação espectrofotométrica da atividade, sendo estas últimas aliquotas combinadas com glicerol para uma concentração final de 40% (v/v).

3.6. Quantificação da SOD, CAT e APX, por espectrofotometria

- Quantificação da SOD

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente, tendo por base o método descrito por Donahue *et al.* (1997), segundo o qual se determina a inibição da fotorredução do NBT, a 560 nm (UV-Vis Shimadzu UV-240). A mistura da reacção é constituída por EDTA 0,093 mM, metionina 12,05 mM, NBT 0,0695 mM, riboflavina 0,0067 mM, extrato proteico e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8 até completar um volume final de 3 mL.

Os tubos de reacção foram invertidos e iluminados com 6 lâmpadas de 8 W, num suporte giratório durante 10 min. A reacção é parada quando a luz é desligada.

Os controlos são obtidos de modo semelhante ocorrendo somente a substituição dos 10 min de iluminação por 10 min de obscuridade.

Os tubos branco foram também preparados quer para a situação de iluminação, quer para a situação de obscuridade e diferiam dos tubos de reação somente por ocorrer a substituição do extrato proteico por igual volume de tampão de homogeneização.

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de redução do NBT a 560 nm.

- Quantificação da CAT

A atividade da catalase foi determinada, espectrofotometricamente, tendo por base o método descrito por Rao *et al.* (1996), segundo o qual se fez reagir numa cuvete, 8 a 12 µg de proteína, 4 µL de H₂O₂ 30%, e um volume de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 de modo a perfazer o volume final de 1 mL.

A diminuição da absorvância devido ao consumo de H₂O₂ pela catalase foi monitorizada a 240 nm (UV-Vis Shimadzu UV-240), com leituras efectuadas aos 0 e 60 segundos, com intervalos de 15 segundos. Com base na Lei de Lambert-Beer e no coeficiente de extinção milimolar para o H₂O₂ 39,4 mM cm⁻¹ (Hwang *et al.*, 1999), é possível ter conhecimento da atividade específica da catalase. Por definição, uma unidade de atividade da catalase é a quantidade de enzima que decompõe uma µmole de H₂O₂ por min a 25°C.

- Quantificação da APX

A atividade da APX foi determinada, espectrofotometricamente, tendo por base o método descrito por Amako *et al.* (1994), segundo o qual se determina a taxa de oxidação do ascorbato pela referida enzima. O volume de reação correspondente a 1 mL, continha na sua composição tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,3, ascorbato 0,5 mM, peróxido de hidrogénio 0,1 mM e 12 µg de extrato proteico. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogénio, após a qual se mediu a taxa de oxidação do ascorbato, a 300 nm (UV-Vis Shimadzu UV-240), durante 30 s (coeficiente de extinção milimolar = 0,49 mM⁻¹ cm⁻¹).

3.7. Estudos da atividade da SOD, CAT e APX em géis nativos de poliacrilamida

- Atividade da SOD

A determinação do padrão de atividade das isoenzimas da superóxido dismutase foi realizada segundo o sistema de Laemmli (Laemmli, 1970), usando um gel nativo de poliacrilamida (gel separador 10%, gel concentrador 4%), numa unidade SE 260 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 10% (gel separador) e espessura de 1,5 mm, na unidade SE 260, foram os seguintes (Quadro 4):

Água desionizada	3770 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	1250 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	3330 µL
Glicerol 87% (v/v)	1150 µL
APS 1,5 % (p/v)	500 µL
TEMED	5 µL
Volume final	10000 µL

Quadro 4 – Composição do gel separador.

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 4% (gel concentrador) e espessura de 1,5 mm, na mesma unidade (SE 260), foram os seguintes (Quadro 5):

Água desionizada	1010 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	625 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	330 µL
Glicerol 87% (p/v)	285 µL
APS 0,25% (p/v)	250 µL
TEMED	12,5 µL
Volume final	2512 µL

Quadro 5 – Composição do gel concentrador.

Antes da aplicação em gel, os extratos enzimáticos foram combinados, na proporção de 1:0,1 com tampão de amostra [sacarose 50% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (v/v)]. A eletroforese decorreu a 4°C, a 15 mA por gel, em tampão Tris-HCL 25 mM e glicina 192 mM a pH 8,3.

A atividade da superóxido dismutase foi efetuada pelo método da redução do nitroazul de tetrazólio (NBT) pelo O_2^- formado fotoquimicamente tendo por base o método descrito por Donahue *et al.* (1997) com ligeiras alterações. Segundo este método os diferentes tipos de SOD são identificadas pelo tratamento dos géis com dois inibidores específicos: o KCN 4 mM (inibe as SOD do tipo Cu/Zn SOD) e o H_2O_2 5 mM (inibe as SOD dos tipos Cu/Zn SOD e Fe SOD).

Os géis são cortados em 3 porções equivalentes sendo cada uma das porções incubada em EDTA 1 mM, em tampão de fosfato de sódio e potássio 50 mM pH 7,8, durante 20 min, à temperatura ambiente com agitação suave e na obscuridade. A uma das porções foi acrescentado KCN 4 mM e a outra H_2O_2 5 mM. Posteriormente estas soluções são rejeitadas, e as porções dos géis são incubadas durante mais 20 min, numa mistura de EDTA 1mM em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM pH 7,8, com NBT 0,24 mM, riboflavina 33,2 μ M e TEMED 0,2% (v/v), sendo designada esta mistura por solução de desenvolvimento de cor. O KCN foi adicionado à mesma porção de gel que já esteve anteriormente incubada com este inibidor para 4 mM, sendo esta situação similar para o outro inibidor (H_2O_2 5 mM). De modo idêntico, esta incubação decorreu à temperatura ambiente, na obscuridade e com agitação suave (cerca de 80 rpm). Após transferência para água destilada os géis foram iluminados, com uma lâmpada de 60 W, até se obter o contraste desejado entre as bandas de atividade acromáticas e o fundo azul escuro. A reação foi parada pela adição de ácido acético 7,5% no qual se armazenaram os géis a 4°C.

- Actividade da CAT

As isoenzimas da catalase foram separadas, eletroforéticamente, segundo o sistema de Laemmli (Laemmli, 1970), usando um gel nativo de poliacrilamida (gel separador 7%, gel concentrador 4%), numa unidade SE 260 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 7% (gel separador) e espessura de 1,5 mm, na unidade SE 260, foram os seguintes (Quadro 6):

Água desionizada	4770 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	1250 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	2330 µL
Glicerol 87% (v/v)	1150 µL
APS 1,5 % (p/v)	500 µL
TEMED	5 µL
Volume final	10000 µL

Quadro 6 – Composição do gel separador.

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 4% (gel concentrador) e espessura de 1,5 mm, na mesma unidade (SE 260), foram os seguintes (Quadro 7):

Água desionizada	1010 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	625 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	330 µL
Glicerol 87% (p/v)	285 µL
APS 0,25% (p/v)	250 µL
TEMED	12,5 µL
Volume final	2512 µL

Quadro 7 – Composição do gel concentrador.

Antes da aplicação em gel, os extratos enzimáticos foram combinados, na proporção de 1:0,1 com tampão de amostra [sacarose 50% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)], contendo DTT 60 mM. A eletroforese decorreu a 4°C, a 80 V, em tampão Tris-HCL 25 mM e glicina 192 mM a pH 8,3.

A atividade da catalase foi detetada tendo por base o método descrito por Clare *et al.* (1984). Os géis foram incubados em *horseradish peroxidase* (HRP) 0,05 mg/mL (p/v) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, com agitação e na obscuridade, durante 45 min. Ao fim deste tempo adicionou-se peróxido de hidrogénio 5 mM e a incubação prosseguiu por 10 min. Seguidamente, os géis foram lavados, duas vezes, em água destilada e incubados com agitação em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL (p/v) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, até se

visualizarem bandas acromáticas num fundo castanho. A reação foi parada com água destilada, na qual os géis podem ser mantidos, a 4°C. Todas as operações descritas anteriormente foram realizadas na obscuridade, à temperatura ambiente e com agitação suave.

- Atividade da APX

A separação eletroforética das isoenzimas da peroxidase do ascorbato foi feita segundo o sistema descontínuo de Laemmli (Laemmli, 1970), usando um gel nativo de poliacrilamida (gel separador 9%, gel concentrador 4%), numa unidade SE 260 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 9% (gel separador) e espessura de 1,5 mm, na unidade SE 260, foram os seguintes (Quadro 8):

Água desionizada	4100 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	1250 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	3000 µL
Glicerol 87% (v/v)	1150 µL
APS 1,5 % (p/v)	500 µL
TEMED	5 µL
Volume final	10000 µL

Quadro 8 – Composição do gel separador.

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 4% (gel concentrador) e espessura de 1,5 mm, na mesma unidade (SE 260), foram os seguintes (Quadro 9):

Água desionizada	1010 µL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	625 µL
Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	330 µL
Glicerol 87% (p/v)	285 µL
APS 0,25% (p/v)	250 µL
TEMED	12,5 µL
Volume final	2512 µL

Quadro 9 – Composição do gel concentrador.

O gel foi previamente incubado em tampão Tris-HCL 50 mM, glicina 192 mM (pH 8,3), com ascorbato 2 mM, a 4°C, com uma corrente de 35 mA, durante 30 min. Posteriormente foram aplicadas as amostras (extratos enzimáticos combinados, na proporção de 1:0,1 com tampão de amostra [sacarose 50% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)], procedeu-se à eletroforese, regulando a amperagem para 15 mA e mantendo a temperatura.

A deteção da atividade da APX foi realizada com base no método descrito por Mittler *et al.* (1993). Os géis foram inicialmente mergulhados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), com ascorbato 2 mM, durante 30 minutos, sendo a solução renovada aos 15 min. Foram, então, incubados numa solução de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), com ascorbato 4 mM e H₂O₂ 2 mM, durante 20 min. Depois de uma lavagem apenas com tampão, durante 1 min, foram mergulhados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), com TEMED 28 mM e NBT 2,45 mM, até serem obtidas bandas claras num fundo escuro (nunca mais de 10 min). Foi efetuada uma última lavagem com água destilada, parando a reação com ácido acético a 10%, solução na qual os géis foram armazenados, a 4°C.

3.8. Análise densitométrica dos géis

Os géis foram digitalizados e a densidade das bandas (a intensidade total de todos os pixels no volume dividida pela área do volume) quantificada com o programa Quantity One Software (Bio-RAD).

4. Quantificação do metalaxil por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

- Preparação das amostras e padrões de calibração

Para cada tratamento (0; 71,60 e 143,20 μM) as variações na concentração de metalaxil foram quantificadas ao longo do ciclo cultural (0, 5, 168 e 312h), recorrendo-se para tal à microextração em fase sólida (SPME) e à análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS).

A quantificação do metalaxil foi efectuada em 4 alíquotas independentes com 5 mL de meio de cultura cada. Neste estudo foram averiguadas variações na concentração de metalaxil em meio de cultura após a filtração das células em suspensão e paralelamente em meio de cultura ao qual só havia sido adicionado o fungicida, isto é, meio onde não se procedeu ao inóculo com células em suspensão.

Antes de se proceder à quantificação do metalaxil foram preparados os padrões de calibração externo e interno. Os padrões externos foram preparados em 5 mL da matriz branco (meio MS) aos quais se adicionou metalaxil de modo a obter um conjunto de soluções com concentração conhecida. O intervalo de concentrações utilizado para a preparação destas soluções variou entre os 0 e os 143,20 μM . As amostras foram diluídas numa proporção de 1:200. A 5 mL da matriz branco (meio MS) adicionou-se cresoxi-metilo, estabelecendo-se deste modo o padrão interno. O padrão interno foi diluído numa proporção de 1:200 e adicionado a todas as soluções, fossem elas padrões externos ou amostras, sempre na mesma concentração (10 mg/L). Devido às elevadas concentrações de metalaxil as amostras a analisar foram também diluídas numa proporção de 1:200. As diluições foram em todos os casos efectuadas com água ultra-pura (Milli-Q water purification system).

- Microextração em fase sólida (SPME)

Neste estudo foi usada a extração direta. Cada extração foi realizada em *vials* de 7 mL que continham 5 mL da amostra a analisar. A amostra foi mantida a uma temperatura de 25°C e magneticamente agitada. A agitação foi constante, a 4500 rpm, e a fibra de Ni-Ti recoberta com

silica foi exposta à solução durante 15 min. A desadsorção ocorreu com uma temperatura de injetor de 250°C.

- Análise GC-MS

A cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa foi realizada num cromatógrafo Varian Saturn 2100T. O hélio foi utilizado como gás de arrasto a um fluxo de 0,7 mL/min. A desadsorção foi realizada nas seguintes condições: Varian VF-SMS de 20 m x 0,15 mm, 15 µm de espessura de revestimento do capilar. O programa de temperaturas foi iniciado com uma temperatura inicial de 80°C durante 2 min, seguida por um aumento de 15°C/min até aos 300°C, sendo esta temperatura mantida por 2 min. Como já foi referido anteriormente a desadsorção ocorreu a uma temperatura de 250°C.

No detetor de massa a ionização ocorreu por impacto eletrónico com uma corrente de emissão de 15 µA. O metalaxil foi quantificado usando uma relação M/Z de 280. A aquisição e tratamento de dados decorreu no software Varian MS Workstation Version 6.9.

5. ESTUDOS *IN VIVO*

5.1. Efeito do Ridomil na germinação de sementes de *Solanum nigrum* L.

As sementes de *S. nigrum* utilizadas neste estudo foram recolhidas em condições laboratoriais a partir frutos provenientes de plantas obtidas em Francos, Porto, Portugal (41°55,79'N e 8°38,19,48'O). Na câmara de fluxo laminar as sementes foram expostas a uma solução de etanol 70% (v/v), em agitação constante, durante 3 min. Após este intervalo de tempo, as sementes permaneceram aproximadamente 30 min na câmara de fluxo, numa placa de Petri contendo papel de filtro, permitindo assim a evaporação do excesso de etanol. Posteriormente as sementes foram transferidas para placas de Petri de vidro (com 90 mm de diâmetro) esterilizadas, contendo dois discos de papel de filtro igualmente esterilizado. Por placa, foram dispostas cerca de 40 sementes de *S. nigrum* e adicionados 5 mL da solução de Hoagland esterilizada por filtração. Esta solução nutritiva foi suplementada com concentrações crescentes do fungicida em estudo: 44,75 µM; 89,50 µM; 179, 0 µM; 268,5 µM e 358 µM; como controlo foi considerada a

situação em que a solução nutritiva não foi suplementada com o fungicida (0 μM). Foram estabelecidas 4 repetições para cada situação experimental.

As placas foram mantidas a 4°C, na obscuridade, durante 2 dias (período de estratificação), sendo posteriormente transferidas para uma câmara de crescimento, com temperatura constante a 23°C e num regime fotoperiódico de 16 horas de luz / 8 horas de obscuridade, durante 28 dias.

5.2. Biometria das plântulas expostas a concentrações crescentes do fungicida em estudo

Decorrido o período experimental anteriormente referido, determinou-se a percentagem de germinação através da contagem do número total de sementes colocadas em cada placa e o número de sementes que germinaram. Outros parâmetros biométricos tais como: o comprimento da raiz primária, o comprimento e número de raízes adventícias, a altura da parte aérea, o número de folhas e a biomassa total, foram determinados em cinco plântulas, representativas da população de um determinado tratamento.

5.3. Efeitos do Ridomil no crescimento e desenvolvimento das plantas

Paralelamente, estudos foram realizados no laboratório onde plântulas de *S. nigrum* com 28 dias após germinação, foram colocadas a crescer em cultura hidropónica durante quatro semanas, na presença de concentrações crescentes de fungicida (0 μM ; 44,75 μM ; 89,50 μM ; 179, 0 μM ; 268,5 μM e 358 μM), sendo diversos parâmetros biométricos analisados. Com estes estudos foi possível esclarecer que plantas expostas a 179,0, 268,5 e 358 μM do agroquímico em estudo, não produziam biomassa suficiente no tempo considerado para se proceder às determinações bioquímicas pretendidas. Assim, somente a parte aérea e as raízes de plantas crescidas na situação controlo (0 μM) e nas situações de 44,75 e 89,50 μM foram congeladas em azoto líquido. Posteriormente este material biológico foi reduzido a pó em azoto líquido e alíquotas foram armazenadas em tubos cónicos de 50 mL a -80°C para posterior análise bioquímica.

5.4. Determinações bioquímicas

- Avaliação do dano membranar

O dano membranar foi determinado pelo método de Heath & Packer (1968), conforme referido anteriormente na página 30.

- Quantificação do peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio foi quantificado pelo método do sulfato de titânio (IV), conforme descrito na página 31.

- Quantificação do teor de prolina livre

O dano membranar foi determinado pelo método de Bates *et al.* (1973), conforme referido anteriormente na página 32.

- SDS-PAGE

A separação de proteínas solúveis utilizando a técnica de SDS-PAGE, foi realizada de acordo com o procedimento descrito na página 32.

- Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi realizada de acordo com Lichtenthaler (1987), utilizando-se como solvente acetona 80%.

Num almofariz contendo areia de quartzo, homogeneizaram-se 120-150 mg de tecido vegetal em 8 mL de acetona 80%. Após homogeneização do material foliar, o extrato foi mantido na obscuridade e centrifugado a 3000 g durante 10 min; o sobrenadante foi transferido para tubos cónicos de 15 mL e completou-se o volume com acetona 80%, perfazendo um volume final de 10 mL. Efetuou-se, de seguida, a leitura das absorvâncias a 470 nm, 647 nm e 663 nm, tendo sido

utilizada a acetona 80% como branco. Os teores clorofilinos e de carotenóides foram calculados a partir das seguintes fórmulas, descritas por Lichtenthaler (1987):

- Clorofila a (mg/dm³) = $12,25 \times \text{Abs}_{663} - 2,79 \times \text{Abs}_{647}$
- Clorofila b (mg/dm³) = $21,50 \times \text{Abs}_{647} - 5,10 \times \text{Abs}_{663}$
- Carotenóides (mg/dm³) = $(1000 \times \text{Abs}_{470} - 1,82 \times \text{Cl a} - 85,02 \times \text{Cl b}) / 198$

Os resultados foram expressos em mg/g peso fresco.

- Estudos da atividade da SOD, CAT e APX em géis nativos de poliacrilamida

Os estudos da atividade da SOD, CAT e APX foram realizados como descrito nas páginas 37-40.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A variabilidade das amostras foi dada pelo desvio padrão da média das várias experimentações. As diferenças significativas foram determinadas pelo teste *t-Student* de *two-tailed* para comparar as médias e um $P < 0,05$ foi considerado significativo.

III. RESULTADOS

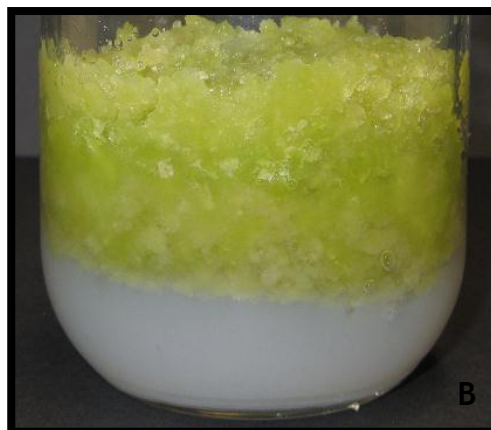
1. Cultura de células em suspensão de *Solanum nigrum* L.

O tecido caloso utilizado para o estabelecimento das células em suspensão foi obtido a partir de fragmentos foliares de plantas jovens de *Solanum nigrum* L. (ver Material e Métodos). Este tecido é mantido em meio de manutenção e subcultivado para meio fresco em intervalos de tempo correspondentes a 28-30 dias, de modo a impedir o aparecimento de lesões necróticas e também para permitir o crescimento do mesmo (Fig. 8A, B).



Fig. 8 A-B Tecido caloso de *Solanum nigrum* L.

A - Tecido caloso crescido durante 28 dias em meio de manutenção. **B** - Pormenor do tecido caloso ilustrado na fotografia anterior, onde é claramente visível a cor verde do mesmo.



Como se pode observar pela análise da Fig. 9, 13 dias após indução da cultura em suspensão, as células apresentavam uma tonalidade creme homogénea e uma densidade celular considerável, como pode ser observado pelos pequenos aglomerados celulares aderentes à superfície vítrea dos matrizes. No centro de cada matraz era também possível detetar as porções de tecido caloso que estiveram na origem destas culturas de células em suspensão. É de referir o facto de estas porções de tecido caloso terem passado de uma coloração verde-amarelada a uma coloração ligeiramente acastanhada, pelo facto da cultura estar a ser mantida em condições de obscuridade. Estas porções de tecido caloso foram removidas nos processos de cultivo subsequentes, de modo a que fosse possível pipetar somente para o meio de manutenção o material vegetal em suspensão.

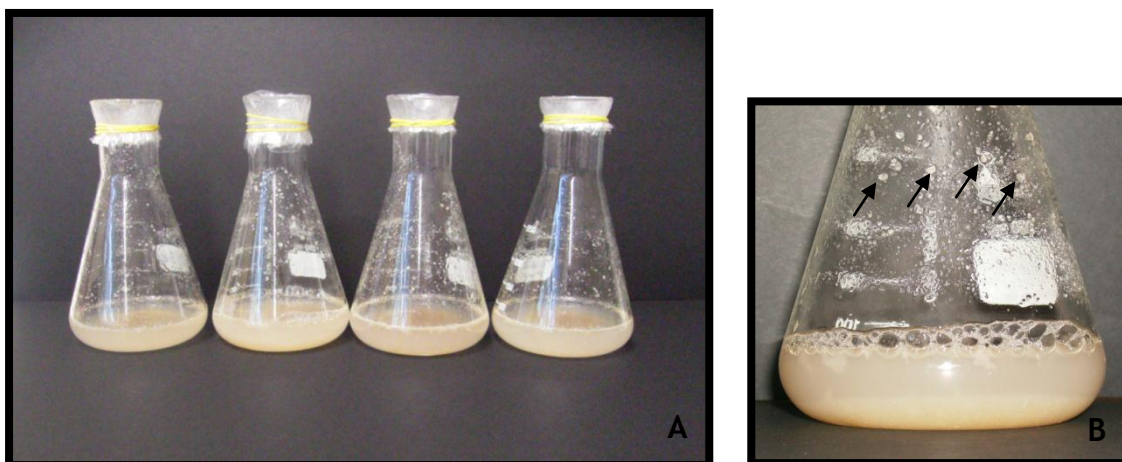


Fig. 9A-B Culturas de células em suspensão de *Solanum nigrum* L. **A** - Culturas de células propagadas durante 13 dias em meio de indução. **B** - Pormenor dos pequenos aglomerados celulares aderentes à superfície vítrea do matraz (setas), o que indica a existência de uma biomassa considerável.

De modo a garantir a integridade das culturas de células em suspensão, estas devem ser mantidas em condições estéreis. A existência de sacarose no meio de cultura (constituente que serve de fonte de carbono à maioria dos microorganismos) associada ao manuseamento impróprio das culturas aumenta o risco da ocorrência de infeções provocadas por bactérias, fungos ou protozoários. Neste estudo, antes do primeiro processo de subcultivo foram efectuadas observações a nível microscópico garantindo minimamente que o volume de inóculo de células em suspensão a ser transferido para meio fresco se encontrava estéril. É de salientar que a observação dos microorganismos tal como se efectuou neste estudo apesar de rápida é extremamente falível. A observação dos microorganismos em microscópios de campo claro é fortemente influenciada pelo tamanho dos mesmos. A reduzida dimensão de algumas estirpes bacterianas e fúngicas não vão permitir a sua observação pela microscopia de campo claro, nem mesmo recorrendo a qualquer método de coloração.

Tendo em mente as limitações acima referidas, neste trabalho a observação de alíquotas de células em suspensão num microscópio de campo claro demonstrou a ausência de qualquer tipo de infecção (Fig. 4). Nesta fase, as células apresentavam uma morfologia externa entre esférica e oval. Foram observados aglomerados celulares (Fig. 4A-C), bem como células isoladas em divisão, cujos núcleos se podiam observar de um modo muito claro (Fig. 4D).

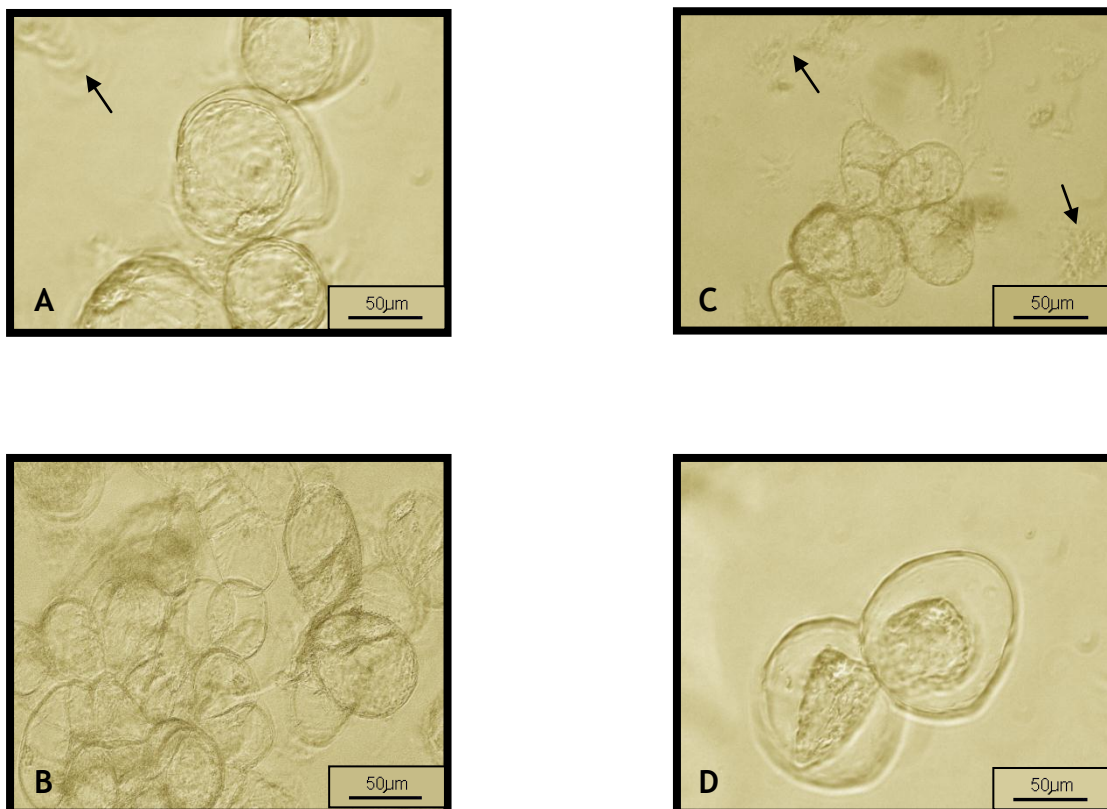


Fig. 10 A-D Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. observadas em microscópio de campo claro numa ampliação 10X. Imagens ilustrativas que demonstram a ausência de qualquer infecção bacteriana ou fúngica. É de referir a existência de fragmentos celulares em algumas imagens (setas).

Os aglomerados celulares correspondiam à fração mais numerosa nestas culturas de células em suspensão. Na maioria destes aglomerados as células com dimensões reduzidas estavam localizadas no centro da estrutura sendo que a dimensão das mesmas aumentava consideravelmente para a periferia (Fig. 4B). Foi de facto notório que as células presentes no centro dos aglomerados apresentavam uma morfologia externa esférica, observando-se mais à periferia destes aglomerados células com uma morfologia oval alongada, forma que se acentuava à medida que aumentava a distância do aglomerado.

2. Intervalo de subcultivo

➤ Peso fresco

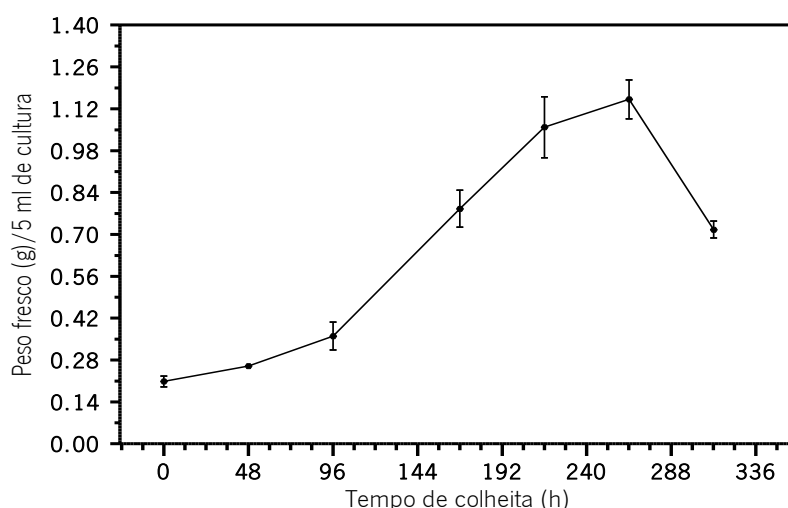
No Gráfico 1 e Tabela 1 é possível constatar um aumento gradual da biomassa ao longo do período experimental até às 264 h (11 dias).

Peso fresco (g)	
0 h	$0,208 \pm 0,018^a$
48 h	$0,261 \pm 0,007^a$
96 h	$0,360 \pm 0,046^b$
168 h	$0,786 \pm 0,062^c$
216 h	$1,058 \pm 0,102^d$
264 h	$1,152 \pm 0,063^d$
312 h	$0,716 \pm 0,028^e$

Tabela 1 – Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) recorrendo ao peso fresco.

A análise dos resultados obtidos, mostra a ocorrência de um aumento na biomassa nas primeiras 48 h (2 dias), ainda que tal aumento não seja estatisticamente significativo.

Gráfico 1 – Variação do peso fresco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas em meio MS. Valores expressos como médias \pm SEM.



Contudo, a avaliação da biomassa nos períodos subsequentes, ou seja, às 96, 168 e 216 h (4, 7 e 9 dias, respetivamente), mostrou que ocorria sempre um aumento significativo da biomassa, obtendo-se após os 9 dias de cultura uma biomassa 5,1 vezes superior à da colheita inicial (tempo 0 h). Às 264 h (11 dias) o aumento da biomassa deixou de ser significativo, dado que a massa das células era semelhante à observada para as 216 h (9 dias), tempo a partir do qual se verificou ocorrer uma diminuição brusca da biomassa até ao fim do período experimental (312 h) e que se traduziu num decréscimo de cerca de 38% em relação ao valor quantificado na colheita anterior.

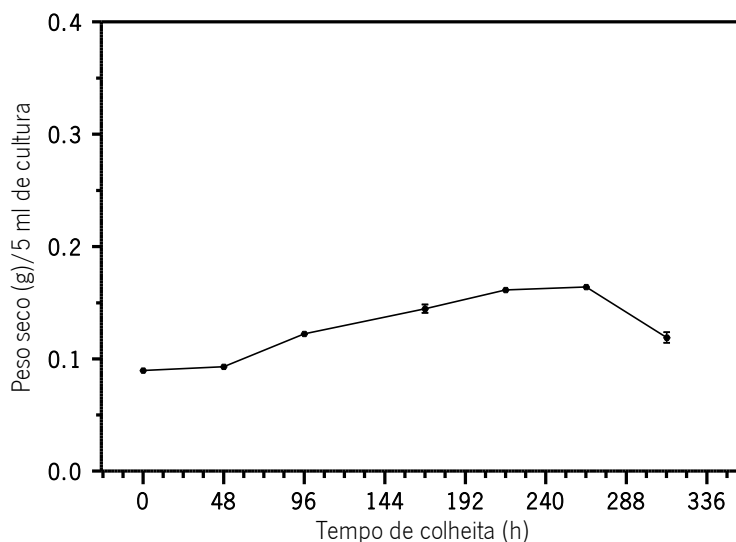
➤ Peso seco

No Gráfico 2 e Tabela 2 é possível observar a variação da biomassa através da determinação da massa celular seca. Esta avaliação, nos intervalos de tempo considerados, mostrou que se verifica um tipo de variação semelhante com a observada quando o crescimento celular foi expresso com base no peso fresco (comparar Gráfico e Tabela PS com Gráfico e Tabela PF).

Peso seco (g)	
0 h	$0,090 \pm 0,001^a$
48 h	$0,093 \pm 0,007^a$
96 h	$0,122 \pm 0,006^b$
168 h	$0,145 \pm 0,002^c$
216 h	$0,161 \pm 0,002^d$
264 h	$0,164 \pm 0,003^d$
312 h	$0,119 \pm 0,005^a$

Tabela 2 – Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) recorrendo ao peso seco.

Gráfico 2 – Variação do peso seco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas em meio MS. Valores expressos como médias \pm SEM.



3. Avaliação da cinética de crescimento de células em suspensão propagadas em meios de cultura suplementados com Ridomil® Gold SL

➤ Peso fresco

Em geral, a biomassa das células em suspensão propagadas em 71,60 e 143,20 µM de Ridomil apresentavam um decréscimo significativo comparativamente à situação controlo (Tabela 3 e Gráf. 3). Exceções foram encontradas nas células em suspensão expostas a 71,60 µM cuja biomassa não diminuía significativamente em relação à situação controlo para os tempos de colheita correspondentes às 96 (4 dias) e 216 h (9 dias) (Tabela 3). Observando o Gráfico 3 e Tabela 3 é possível constatar que o decréscimo na biomassa é para todos os tempos de colheita mais acentuado nas células em suspensão expostas a 143,20 µM.

Tabela 3 – Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão propagadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com Ridomil Gold SL®

Peso fresco (g)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 µM	143,20 µM
0 h	0,591 ± 0,073 ^a	0,591 ± 0,073 ^a	0,591 ± 0,073 ^a
48 h	0,951 ± 0,054 ^a	0,695 ± 0,022 ^{·a}	0,481 ± 0,059 ^{·a}
96 h	1,252 ± 0,131 ^a	0,975 ± 0,060 ^{·b}	0,748 ± 0,068 ^{·b}
168 h	1,476 ± 0,104 ^a	1,166 ± 0,035 ^{·b}	1,025 ± 0,042 ^{·c}
216 h	1,542 ± 0,077 ^a	1,314 ± 0,126 ^{·b}	0,521 ± 0,035 ^{·d}
264 h	1,613 ± 0,071 ^a	1,066 ± 0,089 ^{·b}	0,488 ± 0,007 ^{·d}
312 h	1,661 ± 0,052 ^a	0,857 ± 0,097 ^{·b}	0,383 ± 0,061 ^{·d}

Valores expressos como médias ± SEM. Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

Nas células em suspensão propagadas na ausência de fungicida verificou-se um aumento gradual da biomassa ao longo do período experimental, sem a ocorrência de uma fase de latência notória

(Tabela 3 e Gráf. 3). Nesta situação, a biomassa atingiu o valor máximo às 312 h (13 dias), sendo este valor 2,8 vezes superior relativamente ao obtido na colheita inicial (tempo 0 h).

A análise dos resultados obtidos demonstra variações na curva de crescimento para as células em suspensão expostas a 71,60 μM de Ridomil relativamente à situação controlo (Tabela 3 e Gráf. 3). Tal como se verificou anteriormente para as células propagadas na ausência do fungicida, nesta situação também não é observada uma fase de latência notória. Na Tabela 3 é possível constatar a existência de um aumento significativo da biomassa às 96 h (4 dias), sendo que esta atinge o valor máximo às 216 h (9 dias). A partir das 216 h (9 dias) assiste-se a um declínio progressivo e gradual da biomassa até ao fim do período experimental. Entre este intervalo (216 – 312 h) a biomassa diminui cerca de 1,5 vezes.

A análise da representação gráfica dos valores obtidos (Gráf. 3), mostra que a exposição das células em suspensão a 143,20 μM do fungicida leva a um declínio da biomassa nas primeiras 48 h de tratamento, ainda que esse declínio não seja significativo. Um aumento significativo na biomassa ocorre entre as 48 (2 dias) e as 168 h (7 dias) (Tabela 3 e Gráf. 3). Entre as 168 (7 dias) e 216 h (9 dias) ocorreu um decréscimo acentuado na biomassa (cerca de 2 vezes), sendo que esse decréscimo deixou posteriormente de ter significado, dado que a massa das células era semelhante à das colheitas anteriores (Tabela 3 e Gráf. 3).

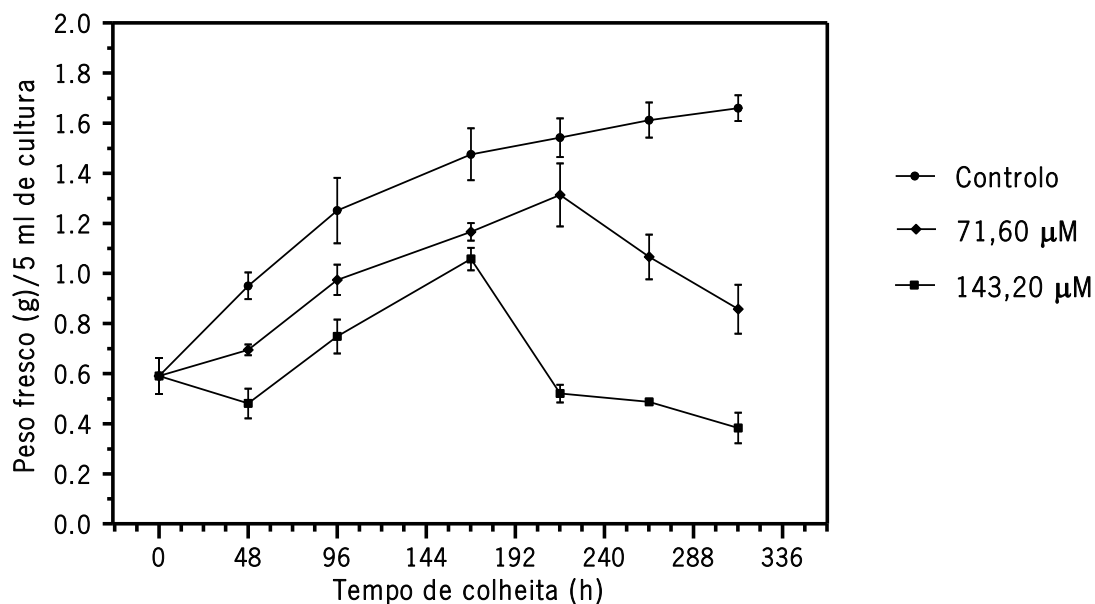


Gráfico F – Variação do peso fresco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.

➤ Peso seco

A análise dos resultados presentes na Tabela 4 mostra que na generalidade, o Ridomil provocava uma diminuição significativa na biomassa das células em suspensão propagadas em ambas as concentrações testadas, relativamente à situação controlo. Analisando separadamente as duas concentrações, verifica-se que as células expostas a 71,60 μM não demonstraram variações significativas no parâmetro em análise nos primeiros 4 dias (entre as 0 e as 96 h, respectivamente), em relação às células propagadas na ausência do fungicida, sendo posteriormente esta variação sempre significativa até ao fim do período experimental (Tabela 4). No entanto, as células em suspensão propagadas em 143,20 μM do fungicida apresentaram sempre um declínio acentuado e significativo em relação às células controlo, ao longo de todo o período experimental.

Tabela 4 – Avaliação da cinética de crescimento das culturas de células em suspensão propagadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com Ridomil Gold SL®

Peso seco (g)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
0 h	0,098 \pm 0,001 ^a	0,098 \pm 0,001 ^a	0,098 \pm 0,001 ^a
48 h	0,109 \pm 0,003 ^a	0,111 \pm 0,008 ^a	0,099 \pm 0,002 ^a
96 h	0,142 \pm 0,010 ^b	0,130 \pm 0,002 ^a	0,107 \pm 0,008 ^a
168 h	0,142 \pm 0,002 ^b	0,132 \pm 0,002 ^a	0,118 \pm 0,004 ^a
216 h	0,145 \pm 0,002 ^b	0,137 \pm 0,002 ^a	0,108 \pm 0,002 ^a
264 h	0,149 \pm 0,001 ^b	0,103 \pm 0,002 ^{ab}	0,101 \pm 0,001 ^{ab}
312 h	0,149 \pm 0,001 ^b	0,082 \pm 0,001 ^c	0,088 \pm 0,007 ^b

Valores expressos como médias \pm SEM. Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Nas 3 situações experimentais é perceptível uma fase lag nas primeiras 48 h (Gráf. 4), sendo essa fase mais notória nas células em suspensão expostas a 143,20 μM . Nas células propagadas na ausência do fungicida a biomassa atinge o valor máximo às 96 h (4 dias), sendo

aproximadamente 1,5 vezes superior em relação ao obtido na colheita inicial (tempo 0 h). A partir das 96 h (4 dias), não ocorreram flutuações significativas nos valores obtidos para este parâmetro até ao fim do período experimental 312 h (13 dias) (Tabela 4 e Gráf. 4).

A análise dos valores representados na Tabela 4, mostra que até às 216 h (9 dias), não ocorreram variações significativas para as células em suspensão expostas a 71,60 μM do fungicida, ainda que se verifique um aumento dos valores relativamente ao início da actividade experimental. No entanto, a partir das 216 h (9 dias) assistiu-se a uma redução drástica nos valores de biomassa obtidos. Entre as 216 (9 dias) e as 264 h (11 dias) os valores de biomassa surgiam diminuídos cerca de 1,3 vezes, verificando-se o mesmo para o intervalo de tempo decorrente entre as 264 (11 dias) e as 312 h (13 dias).

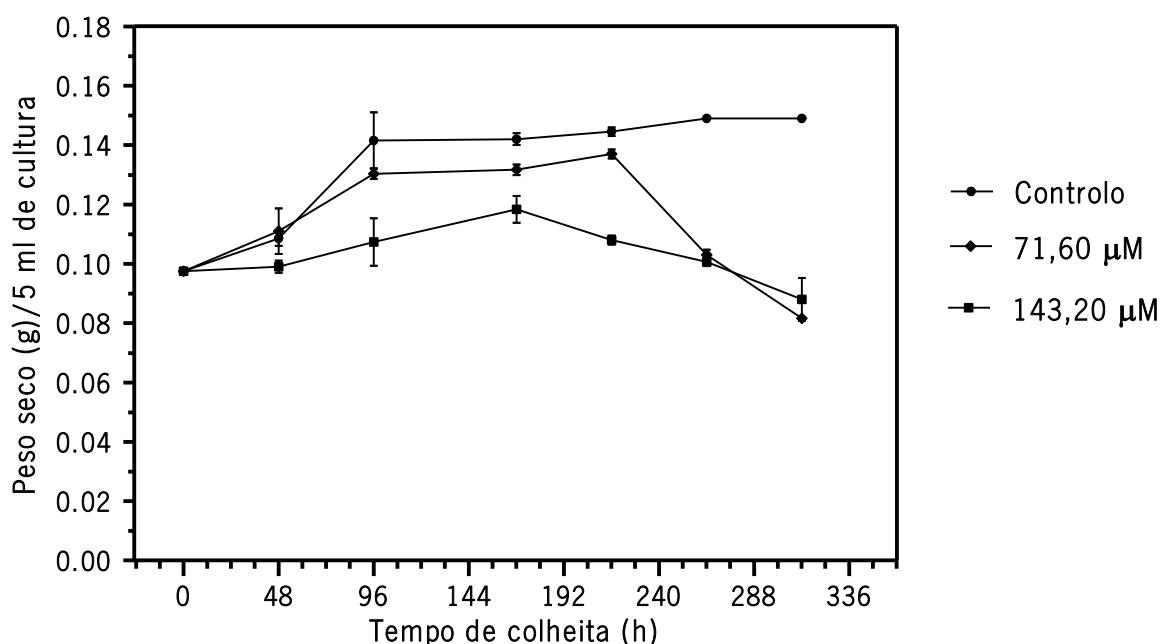


Gráfico 4 – Variação do peso seco quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.

Relativamente à concentração mais elevada de Ridomil utilizada neste trabalho verificou-se que à semelhança do que se observou para as células em suspensão expostas a 71,60 μM do fungicida não ocorreram flutuações significativas da biomassa até às 216 h (9 dias). Entre as 216 (9 dias) e as 264 h (11 dias) os valores de biomassa surgiram significativamente diminuídos sendo que esse declínio se acentuou ainda que não significativamente até ao fim do período experimental.

3. Avaliação da viabilidade celular com azul de tripano

A viabilidade da cultura de células em suspensão foi determinada pelo teste de exclusão do azul de tripano. No método de exclusão com azul de tripano as células azuis correspondem a células mortas (não viáveis). Após a entrada na célula o corante atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam corados de azul.

Analisando os resultados obtidos é possível observar uma redução da viabilidade celular que se vai acentuando consoante o aumento da concentração de fungicida utilizada. Também foi notória uma redução mais acentuada da viabilidade celular de células colhidas às 312 h (13 dias) em comparação com células colhidas às 168 h (7 dias).

Os dados obtidos com este teste permitiu constatar que a morfologia da população das células em suspensão de *Solanum nigrum* L. consiste basicamente em três frações: células isoladas que assumem diversas formas, agregados celulares e células filiformes. Na situação controlo tanto para as 168 h (7 dias) como para as 312 h (13 dias) verificou-se um predomínio de agregados celulares e de células em divisão activa (Figs. 11 e 12). Para os mesmos intervalos de tempo foi observado um predomínio de células isoladas para as células em suspensão cultivadas em 71,60 μM de Ridomil. Células filiformes foram por sua vez predominantes na cultura de células em suspensão cultivadas em 143,20 μM do fungicida, tanto para as 168 h (7 dias) como para as 312 h (14 dias).

A contagem das células viáveis na câmara de Neubauer permitiu verificar uma diminuição significativa de cerca 11% entre a situação controlo e as células propagadas em 71,60 μM do fungicida no intervalo de tempo correspondente às 168 h (7 dias). Um decréscimo ainda mais acentuado na viabilidade celular ocorreu para a concentração de 143,20 μM , para a qual se verificou uma diminuição significativa de cerca 24% (Tabela 5 e Gráf. 5). No intervalo de tempo correspondente às 312 h (13 dias) detetou-se também uma diminuição na viabilidade celular de cerca 14% e 26% para 71,60 e 143,20 μM , respetivamente. Analisando a Tabela 5, verifica-se que apesar de ter ocorrido uma diminuição da viabilidade celular entre as 168 h (7 dias) e as 312 h (13 dias) para as diferentes concentrações testadas, essa redução não foi estatisticamente significativa.

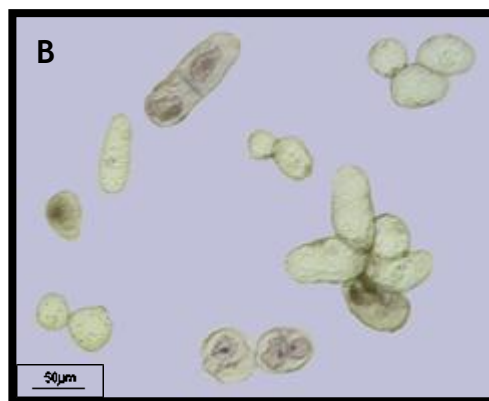
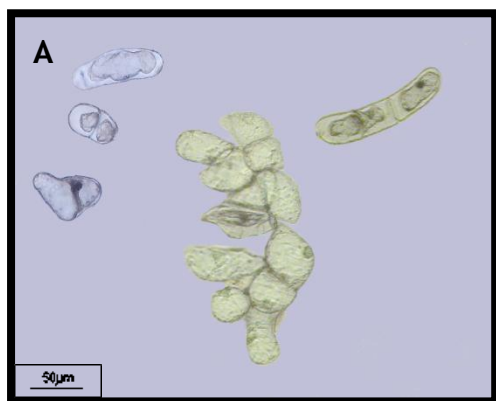


Figura 11 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 7 dias após o subcultivo na ausência de fungicida.

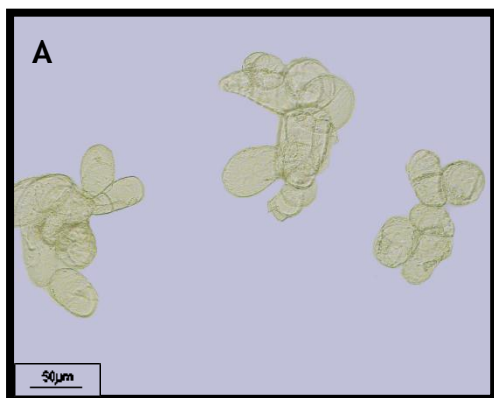
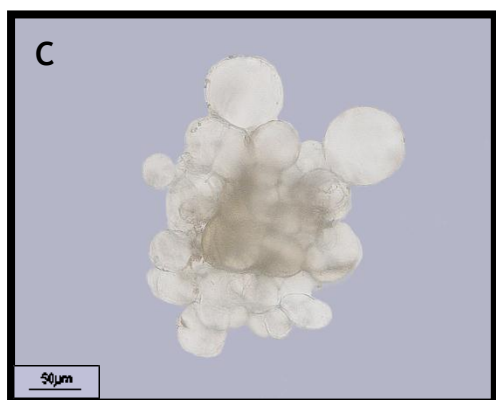
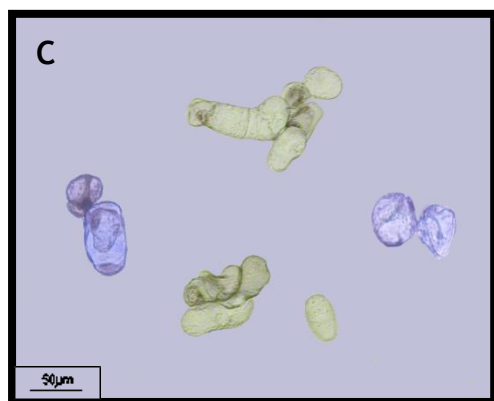


Figura 12 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 14 dias após o subcultivo na ausência de fungicida.



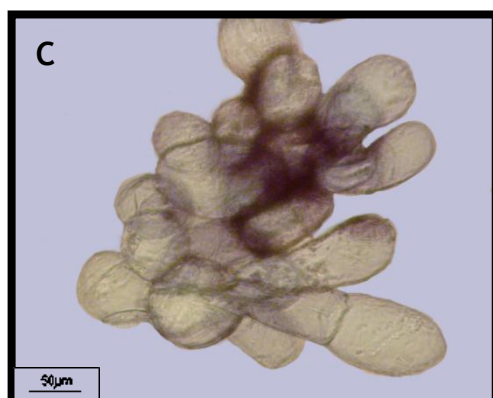
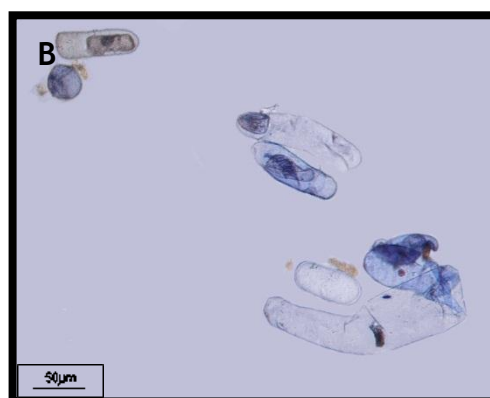
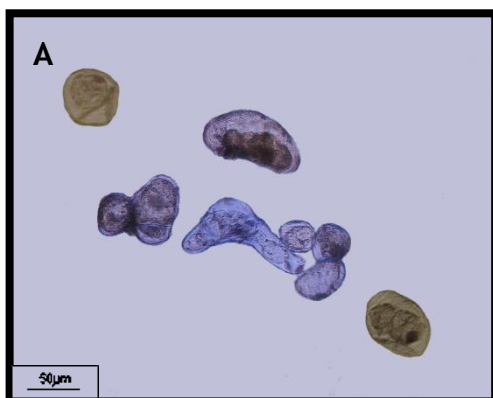


Figura 13 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripiano, 7 dias após o subcultivo na presença de 41,60 μ M de fungicida.

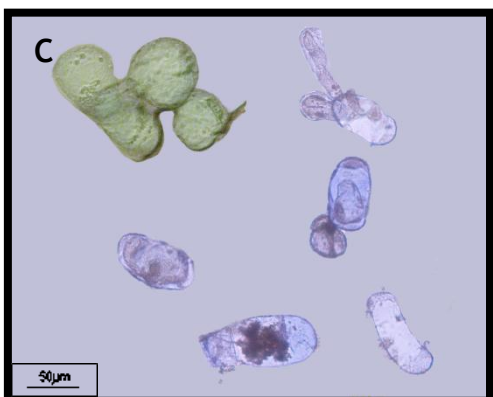
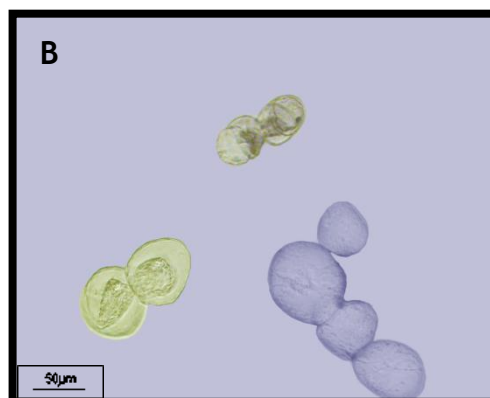
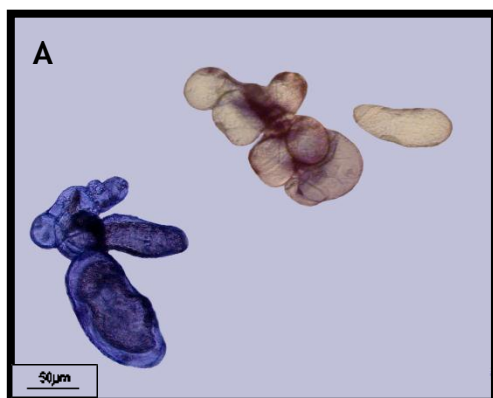


Figura 14 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripiano, 14 dias após o subcultivo na presença de 71,60 μ M de fungicida.

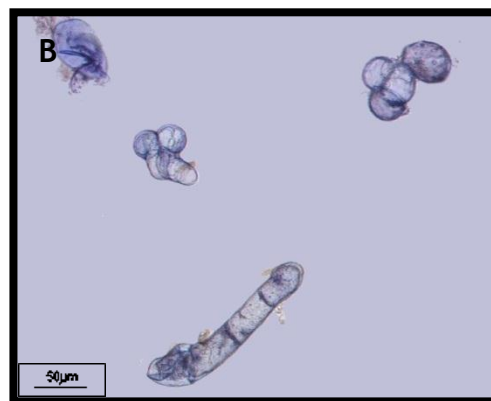
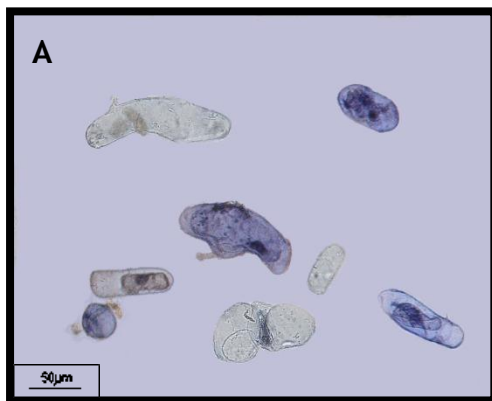


Figura 15 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 7 dias após o subcultivo na presença de 143,20 μ M de fungicida.

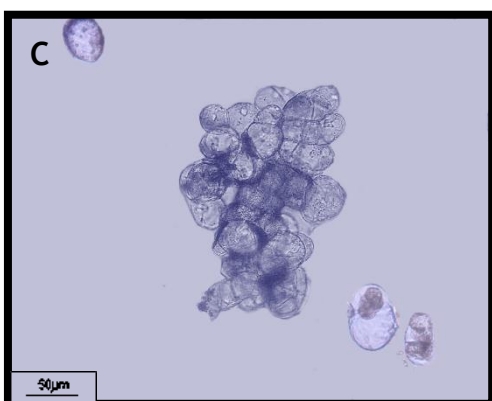
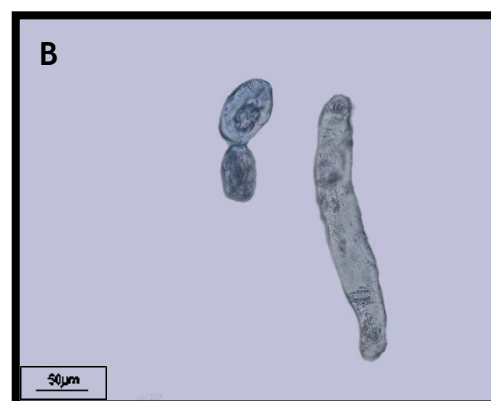


Figura 16 – Células em suspensão de *Solanum nigrum* L. submetidas ao teste do azul de tripano, 13 dias após o subcultivo na presença de 143,20 μ M de fungicida.

Tabela 5 – Viabilidade celular na cultura de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL[®].

Percentagem da viabilidade celular			
Tempo de colheita	Controlo	44,75 μM	89,5 μM
7 d	63,46 \pm 0,572 ^a	52,42 \pm 3,489 ^a	39,51 \pm 3,010 ^a
13 d	61,54 \pm 2,422 ^a	47,89 \pm 2,592 ^a	35,37 \pm 2,382 ^a

Valores expressos como médias \pm SEM (n=3). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

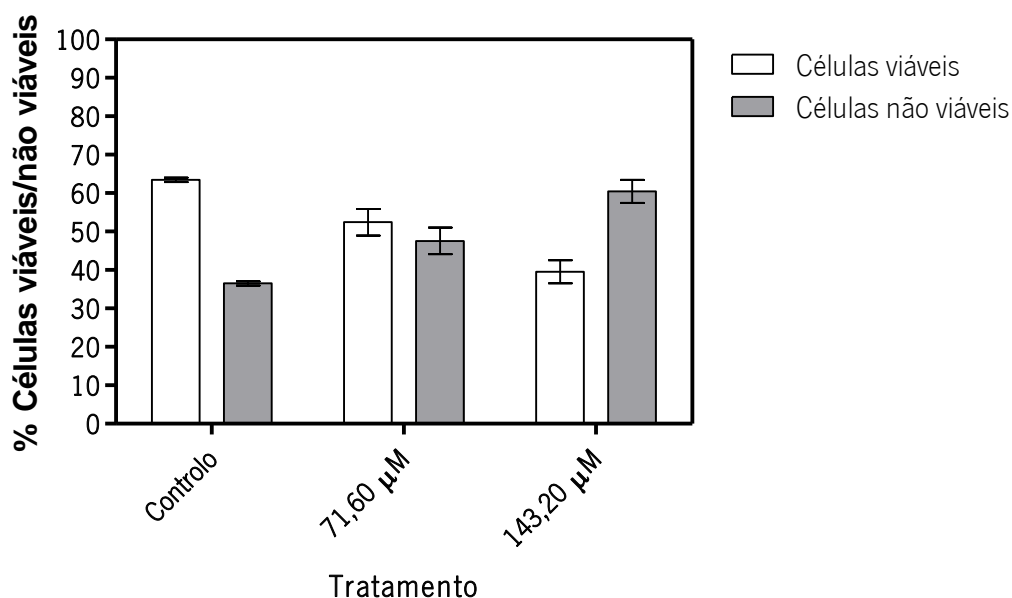


Gráfico 5 – Percentagem da viabilidade celular da cultura de células em suspensão 168 h (7 dias) após o subcultivo em 0; 71,60 e 143,20 μM de Ridomil. Valores expressos como médias \pm SEM.

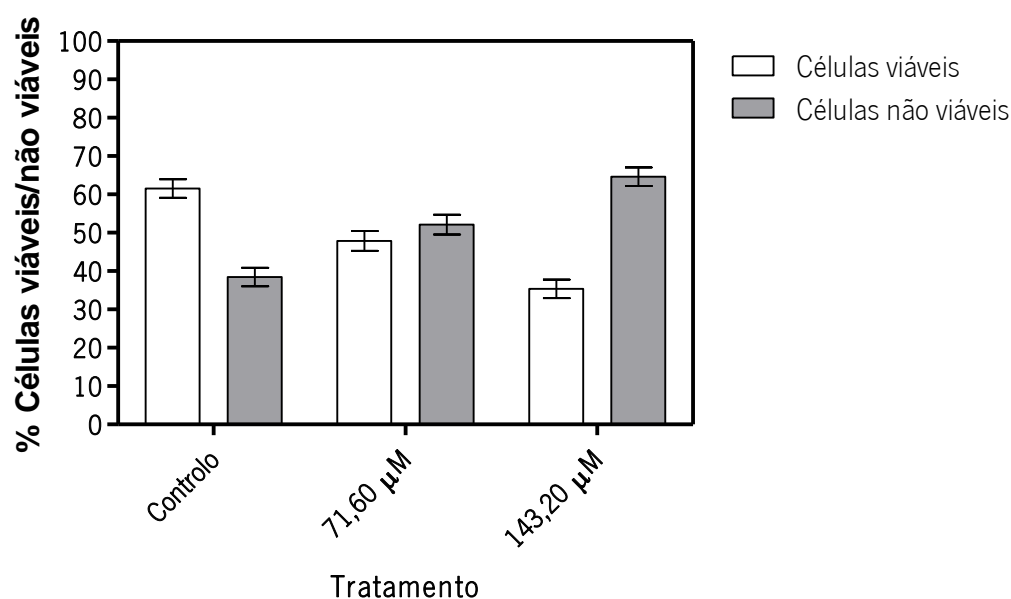


Gráfico 6 – Percentagem da viabilidade celular da cultura de células em suspensão 312 h (13 dias) após o subcultivo em 0; 71,60 e 143,20 µM de Ridomil. Valores expressos como médias \pm SEM.

5. Determinações bioquímicas

- Avaliação do dano membranar

Os danos membranares sofridos pelas células em suspensão foram avaliados através da quantificação de TBARS.

A análise dos valores obtidos (Tabela 6 e Gráf. 7), mostra que não ocorreram variações significativas nos níveis de TBARS relativamente à situação controlo, ao longo do período experimental, enquanto que nas células em suspensão crescidas em meio de cultura suplementado com Ridomil, esses níveis aumentaram consideravelmente ao longo do ciclo de cultura.

Decorridas 5 h após a exposição das células em suspensão ao fungicida, os níveis médios de TBARS diferiam significativamente em comparação com a situação controlo, com aumentos de cerca de 1,7 e de 2,2 vezes para as células em suspensão expostas a 71,60 µM e a 143,20 µM de Ridomil, respetivamente (Tabela 6 e Gráf. 7). Aumentos significativos nos níveis de TBARS

foram igualmente observados no 8º e 14º dia, comparativamente ao controlo. Analisando os valores apresentados na Tabela 6, observa-se que relativamente ao 7º dia os níveis de TBARS surgiam aumentados cerca de 2,5 e 4 vezes para as concentrações 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, respetivamente, enquanto que no 13º dia os aumentos eram de cerca de 3,9 e 5,3 vezes para as mesmas concentrações do fungicida.

Tabela 6 - Níveis de TBARS quantificados em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 µM e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®.

TBARS (nmol/gp.f.)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 µM	143,20 µM
0 h	13,14 ± 0,247 ^a	13,14 ± 0,247 ^a	13,14 ± 0,247 ^a
5 h	13,12 ± 0,348 ^a	22,06 ± 2,066 ^b	28,47 ± 3,449 ^b
7 d	12,51 ± 0,270 ^a	31,72 ± 3,625 ^c	48,49 ± 7,811 ^c
13 d	12,85 ± 0,379 ^a	49,82 ± 0,348 ^d	68,40 ± 0,272 ^d

Valores expressos como médias ± SEM (n=8). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

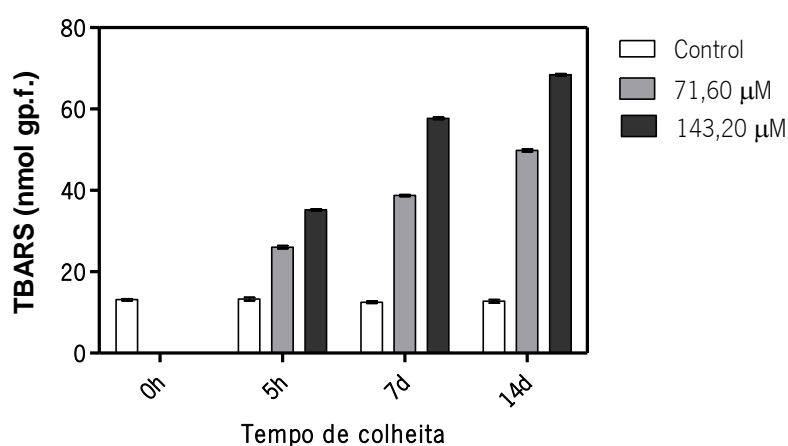


Gráfico 7 - Níveis de TBARS quantificados em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.

Aumentos significativos nos níveis de TBARS foram observados nas culturas de células em suspensão propagadas em ambas as concentrações testadas. Para a concentração de 71,60 μM as diferenças observadas nos níveis de TBARS foram cerca de 1,7, 1,4 e 1,6 vezes para os intervalos de tempo considerados (Tabela 6 e Gráfico 7). Para a concentração de 143,20 μM , observou-se que os níveis de TBARS surgiam aumentados cerca de 2,2 vezes após as 5h e nos dois intervalos subsequentes (5 h - 7º dia e 7º dia - 13º dia) tiveram um aumento menos acentuado de cerca de 1,7 e 1,4 vezes, respetivamente.

- Quantificação do peróxido de hidrogénio

Os resultados obtidos para a quantificação dos níveis de H_2O_2 , que se encontram descritos na Tabela 7, mostraram que ocorria um aumento desta espécie reactiva de oxigénio nas células em suspensão propagadas em meio de cultura suplementado com Ridomil, relativamente à situação controlo. Os níveis de H_2O_2 não refletiram flutuações significativas ao longo do ciclo de cultura nas células em suspensão propagadas na ausência de Ridomil. A quantificação do H_2O_2 realizada 5 h após a exposição das células a 71,60 μM do fungicida mostrou que os níveis desta ROS eram semelhante à situação controlo. No entanto, nas células em suspensão suplementadas com o dobro da concentração do referido fungicida (143,20 μM), os níveis de H_2O_2 foram aproximadamente 1,4 vezes superiores ao controlo. Nas células em suspensão colhidas ao 7º dia surgia um aumento nos níveis de H_2O_2 de cerca 1,4 e 1,6 vezes nos meios suplementados com 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, respetivamente. Comportamento semelhante foi manifestado pelas células em suspensão colhidas no fim do ciclo cultural (13º dia). Estas apresentavam níveis de H_2O_2 significativamente superiores em relação ao controlo, cerca de 2 e 2,3 vezes para células propagadas em 71,60 e 143, 20 μM de Ridomil, respetivamente (Tabela 7 e Gráf. 8).

Tabela 7 – Níveis de H₂O₂ quantificados em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 µM e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®.

Peróxido de Hidrogénio (nmol/gp.f.)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 µM	143,20 µM
0 h	532,7 ± 15,08 ^a	532,7 ± 15,08 ^a	532,7 ± 15,08 ^a
5 h	553,9 ± 11,79 ^a	593,6 ± 8,095 ^a	761,3 ± 5,357 ^b
7 d	565,5 ± 17,86 ^a	823,8 ± 21,43 ^b	903,6 ± 10,71 ^c
13 d	544,4 ± 2,738 ^a	1115,0 ± 55,36 ^c	1249,0 ± 29,76 ^d

Valores expressos como médias ± SEM (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

Ao longo do ciclo de cultura os níveis de H₂O₂ aumentaram progressivamente nas células em suspensão propagadas em meio suplementado, quer com 71,60, quer com 143,20 µM de Ridomil. A análise estatística revelou que para a concentração de 71,60 µM os níveis de H₂O₂ 5 h após a exposição ao fungicida não eram significativamente diferentes, enquanto que para o mesmo intervalo de tempo (5 h), a exposição das células a 143,20 µM do fungicida era

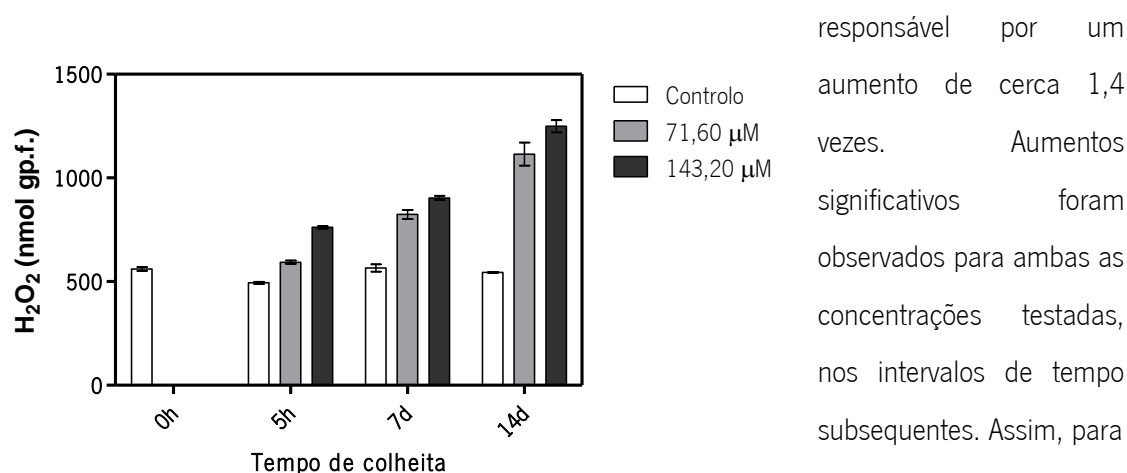


Gráfico 8 – Níveis de H₂O₂ quantificados em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.

a concentração de 71,60 μM os aumentos nos níveis de H_2O_2 entre as 5 h e o 7º dia e entre o 7º e o 13º dia, foram de cerca 1,4 e 1,3 vezes, respetivamente.

Para os mesmos

intervalos de tempo, mas para a concentração mais elevada do fungicida (143, 20 μM), as diferenças nos níveis de H_2O_2 foram semelhantes às observadas para a concentração mais baixa (cerca de 1,4 e 1,2 vezes, Tabela 7 e Gráf. 8).

- Prolina

A análise dos resultados obtidos, mostra que ao longo do período experimental não ocorreram flutuações significativas no teor de prolina na situação controlo (Tabela 8 e Gráfico 9), enquanto que nas células em suspensão crescidas em meio de cultura suplementado com Ridomil aumentou consideravelmente ao longo do ciclo de cultura.

No Gráfico 9 e Tabela 8 é possível constatar que, 5 h após a exposição das células em suspensão a 71,60 μM de Ridomil, o teor médio de prolina diferia significativamente do da situação controlo. No entanto, nas culturas de células em suspensão suplementadas com 143,20 μM , o teor de prolina foi aproximadamente 2 vezes superior relativamente ao controlo. No 7º e 13º dia verificou-se que os níveis de prolina eram sempre significativamente superiores em relação ao controlo, para ambas as concentrações testadas (Tabela 8, Gráfico 9), surgindo aumentados ao 7º dia cerca de 2,4 e 3 vezes, para as concentrações de 71,60 e 143,60 μM , respetivamente, verificando-se que no fim do período experimental (13 dias) a variação dos níveis de prolina eram ainda mais acentuados, observando-se aumentos de cerca de 5,6 e 6,4 vezes para 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, respetivamente.

Tabela 8 - Teor de prolina quantificado em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®.

Prolina ($\mu\text{g/gp.f.}$)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
0 h	82,78 \pm 3,388 ^a	82,78 \pm 3,388 ^a	82,78 \pm 3,388 ^a
5 h	85,85 \pm 3,397 ^a	130,70 \pm 11,890 ^b	189,20 \pm 5,867 ^{*b}
7 d	83,30 \pm 3,522 ^a	197,10 \pm 2,987 ^{*c}	235,80 \pm 2,760 ^{*c}
13 d	91,35 \pm 2,834 ^a	511,70 \pm 33,24 ^{*d}	587,00 \pm 10,12 ^{*d}

Valores expressos como médias \pm SEM (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Durante o ciclo de cultura o teor médio de prolina aumentou progressivamente e significativamente nas células em suspensão expostas, quer a 71,60, quer a 143,20 μM de Ridomil. Para a concentração de 71,60 μM , verificou-se que o teor de prolina surgiu aumentado cerca de 1,6 vezes logo após 5 h de exposição ao fungicida, diferença que se acentuou entre as 5 h e o 7º dia e entre o 7º e o 13º dia (aumento de 1,5 e 2,6 vezes, respetivamente, Tabela 8).

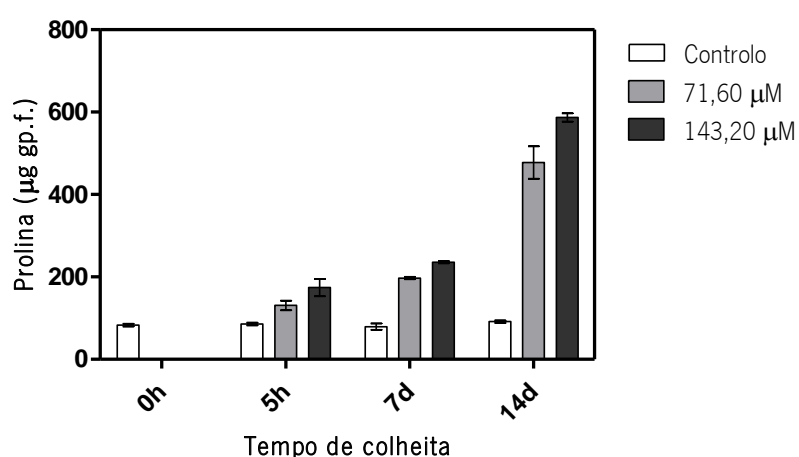


Gráfico 9 – Teor de prolina quantificado em culturas de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.

Para a concentração de 143,20 μM as diferenças observadas nos níveis de prolina foram cerca de 2,1, 1,4 e 2,5 vezes para os intervalos de tempo considerados (Tabela 8 e Gráfico 9).

- Proteínas solúveis

A análise dos resultados presentes na Tabela 9 mostra que no presente estudo, o Ridomil provocou aumento no conteúdo de proteínas solúveis para ambas as concentrações testadas.

Tabela 9 – Teor proteico solúvel em extratos de células em suspensão propagadas na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL[®], no fim do ciclo cultural (13 d).

Polipeptídeos ($\mu\text{g/gp.f.}$)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
13 d	197,2 \pm 3,182	198,9 \pm 1,729	241,90 \pm 10,680 *

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

O teor de proteínas solúveis presente nos extratos de células em suspensão cultivadas na presença de 143,20 μM de Ridomil surgiu aumentado significativamente cerca de 22%, em relação à situação controlo (Tabela 9). Um comportamento diferente foi observado para as células em suspensão cultivadas na concentração mais baixa do fungicida (71,60 μM), uma vez que o valor encontrado para o teor proteico foi praticamente igual ao do da situação controlo.

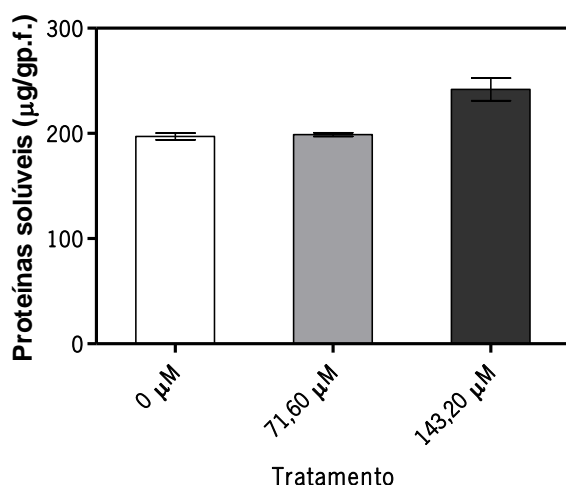


Gráfico 10 – Teor de proteínas solúveis quantificadas em extratos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

Para além da quantificação bioquímica das proteínas solúveis, os polipeptídeos de extratos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de Ridomil, foram separados por SDS-PAGE.

Apesar de surgirem diferenças nos níveis de proteínas solúveis, os perfis eletroforéticos não mostraram a existência de novas bandas polipeptídicas para as diferentes situações experimentais, ocorrendo somente diferenças quantitativas (Fig 17).

Conforme se pode observar na Fig. 17, a banda polipeptídica com massa molecular de aproximadamente 116 kDa surge com uma coloração mais intensa nas células em suspensão expostas a 143,20 μ M do fungicida. A análise ao densitómetro permitiu detetar um aumento de cerca de 38% na acumulação de polipeptídeos relativamente à situação controlo. Comportamento semelhante foi observado para as bandas polipeptídicas com aproximadamente 52 e 37 kDa, sendo o aumento nos níveis de polipeptídeos correspondentes a cerca de 47 e 33%, respectivamente (Fig 17). Entre os 19,834 e os 6,873 kDa destaca-se a coloração mais intensa evidenciada pelas bandas polipeptídicas de extratos proteicos de células expostas quer a 71,60, quer a 143, 20 μ M do fungicida relativamente à situação controlo. Neste caso, o aumento na acumulação de polipeptídeos foi cerca de 6%, para ambas as concentrações. A análise densitométrica mostrou também a existência de uma banda mais intensamente corada nas células em suspensão cultivadas na menor concentração do fungicida, ocorrendo nesta situação um aumento na acumulação de polipeptídeos de cerca de 7%. O aparecimento de algumas bandas polipeptídicas com diferentes intensidades de coloração mostra a ocorrência de diferenças quantitativas em determinado polipeptídeo entre as células em suspensão cultivadas na ausência e na presença do fungicida em estudo, sendo estas diferenças mais evidentes para as células expostas a 143,20 μ M do fungicida.

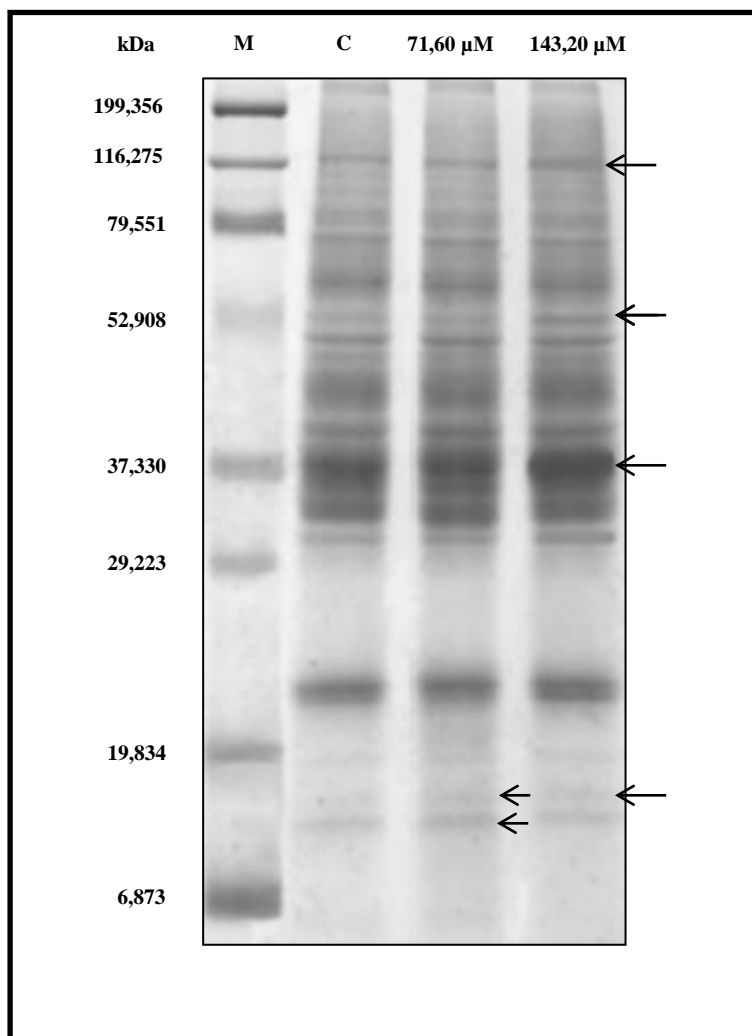


Figura 17 – Perfil eletroforético dos polipeptídeos solúveis de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 µM de Ridomil, no fim do ciclo cultural (dia 13). Os polipeptídeos foram visualizados no gel através da coloração com azul de Coomassie. M – marcador de massa molecular; setas – polipeptídeos cuja acumulação variou.

6. Efeitos do Ridomil nos níveis de atividade da SOD, CAT e APX

- SOD

Em relação à enzima superóxido dismutase, o Ridomil induziu um aumento significativo, da atividade total da enzima, nas células em suspensão propagadas em ambas as concentrações em estudo.

Tabela 10 – Quantificação da atividade da SOD em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL[®], por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).

Atividade da SOD (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
13 d	106,8 \pm 4,987	152,8 \pm 2,424*	242,80 \pm 4,952*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

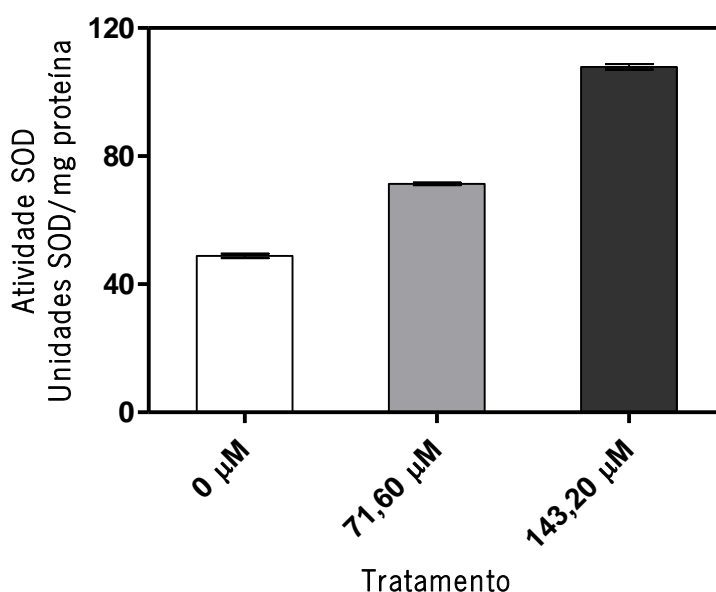


Gráfico 11 – Quantificação da superóxido dismutase em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

Os extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na presença de 41,60 μM de Ridomil exibiram um aumento na atividade da SOD de cerca 1,4 vezes em comparação com a situação controlo. Para a concentração mais elevada (143,20 μM), esse aumento foi de cerca 2,2 vezes, face ao controlo (Tabela 10 e Gráf. 11).

A análise dos zimogramas obtidos em gel nativo mostra que a presença de Ridomil não alterou o padrão de bandas de atividade da SOD, ou seja, não alterou nem os tipos de SOD, nem o padrão de isoenzimas de SOD. No entanto, a análise densitométrica dos géis está de acordo com os

resultados da quantificação da atividade total da SOD, ou seja, os valores de atividade surgem aumentados nas situações de tratamento com Ridomil em relação à situação controlo.

A diferente sensibilidade aos inibidores específicos KCN e H_2O_2 foi usada para distinguir os três tipos de SODs em gel nativo, tendo sido identificadas cinco bandas de MnSOD (SOD1, 2, 3, 4, 5), uma FeSOD (SOD6) e uma CuZnSOD (SOD7). Na figura 18A, a atividade enzimática foi revelada na ausência dos inibidores específicos, enquanto que a figura 18B mostra a atividade na presença de KCN e a figura 18C na presença de H_2O_2 .

A análise da figura 18 permite visualizar duas bandas (SOD1 e 2) identificadas como MnSOD, com uma menor intensidade de coloração e com uma menor espessura relativamente a todas as outras. A análise densitométrica desta banda, mostrou que a atividade não apresentava variações significativas nos extratos correspondentes aos diferentes tratamentos a que as células foram sujeitas. Já a banda 3 (SOD3), claramente a mais proeminente entre as sete bandas, mostrava aumento de atividade principalmente nos extratos de células em suspensão expostos a 143,20 μM do fungicida. A comparação dos zimogramas e a análise densitométrica da intensidade das bandas, mostrou igualmente que o tratamento com Ridomil induziu aumento da atividade da SOD4 e SOD5, identificadas também como MnSOD. A SOD4 surgiu com um aumento de cerca 39% nos extratos de células expostos quer a 71,60 quer a 143,20 μM do fungicida relativamente à situação controlo, enquanto que a SOD5 mostrou um aumento significativo de cerca 32% e 73%, para as células expostas a 71,60 e 143,20 μM do fungicida, respetivamente.

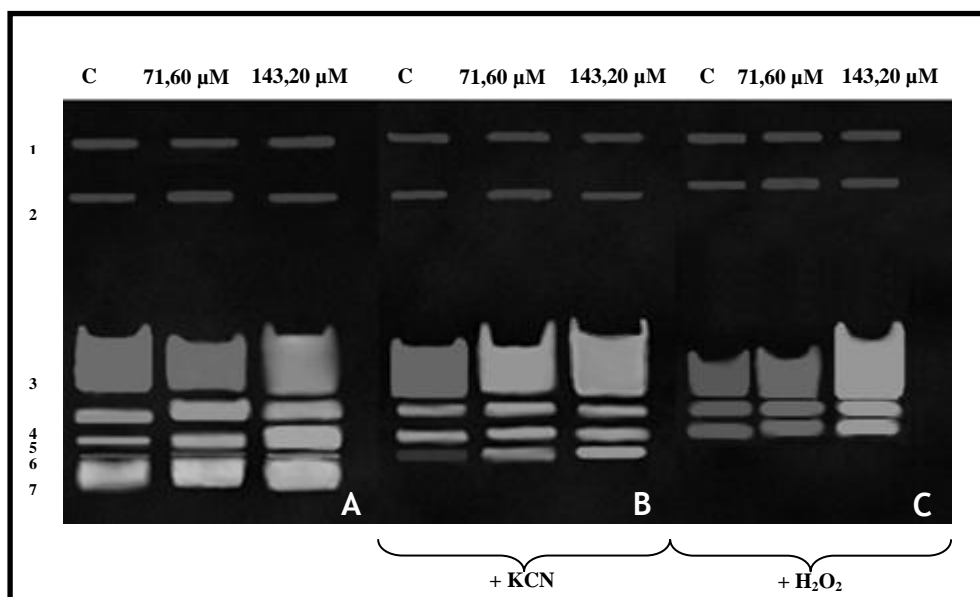


Figura 18 – Detecção da atividade das SOD em gel nativo, no qual foram utilizadas 70 µg de proteína de extratos de células em suspensão da situação controlo e das situações de tratamento com Ridomil (71,60 e 143,20 µM). A sensibilidade diferencial das SOD ao KCN (B) e ao H₂O₂ (C) foi usada para distinguir os 3 tipos de SOD: (SOD1, 2, 3, 4, 5 = MnSOD; SOD6 = FeSOD; SOD7 = CuZn/SOD). A intensidade relativa das bandas de atividade nas várias situações foi quantificada por análise densitométrica e comparada com a intensidade das bandas controlo definida como 100%.

É ainda possível detetar a existência de mais duas bandas, a SOD6 e a SOD7, que correspondem à FeSOD e Cu/ZnSOD, respetivamente, e que não apresentavam variações significativas de atividade nas situações de tratamento em relação à situação controlo. Estranhamente após tratamento com cianeto de potássio a banda 6 (FeSOD) apresentava uma coloração mais intensa. A banda correspondente à SOD7 foi identificada como Cu/ZnSOD, atendendo à sensibilidade desta banda aos dois inibidores KCN e H₂O₂.

Numa tentativa de melhorar o zimograma obtido, realizaram-se diversos ensaios, alterando-se a quantidade de proteína utilizada no gel nativo. No entanto, a utilização de teores de proteína inferiores a 60 µg conduzia à observação de um menor número de bandas em consequência da redução do teor de proteínas utilizado. Por outro lado, a utilização de quantidades de proteína superiores a 70 µg tinha como consequência a coalescência de bandas, levando a uma interpretação de duas ou mais isoenzimas de SOD como apenas uma.

- CAT

A propagação das células em suspensão em meios de cultura suplementados com Ridomil provocou um aumento significativo na atividade da catalase, sendo este aumento proporcional ao aumento da concentração de fungicida presente no meio de cultura.

Tabela 11 – Quantificação da atividade da CAT em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL[®], por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).

Atividade da CAT (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
13 d	106,8 \pm 4,987	152,8 \pm 2,424*	242,80 \pm 4,952*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

A análise dos resultados obtidos mostra que, comparativamente ao controlo, a atividade da catalase surgiu aumentada cerca de 1,4 e 2,3 vezes, para as concentrações de Ridomil de 71,60 e 143,20 μM , respetivamente.

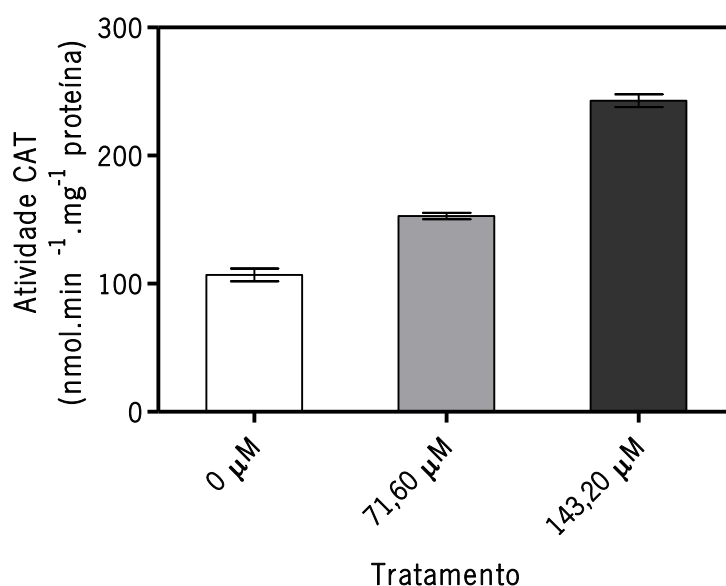


Gráfico 12 – Quantificação da catalase em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

Nos extratos proteicos de células em suspensão foram detectadas duas isoenzimas da catalase, como ilustrado na Figura 19. No gel, a banda com menor mobilidade, foi designada CAT 1 e a de maior mobilidade CAT 2.

O zimograma mostrou claramente que a CAT 2 é a isoenzima mais abundante no modelo de estudo utilizado neste trabalho (Fig 19), e a análise densitométrica revelou que na situação controlo a diferença de atividade entre a CAT 2 e a CAT 1 é de cerca 32%. A diferença mantém-se nas situações de tratamento, observando-se em 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, aumento de atividade da CAT 2 relativamente à CAT 1, de cerca de 53 e 56 %, respectivamente.

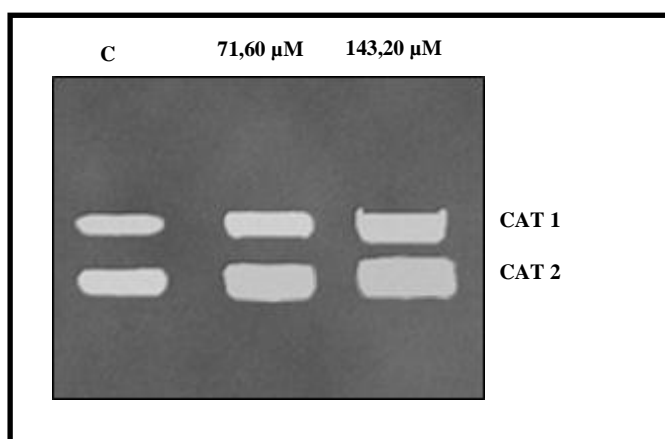


Figura 19 – Padrão de atividade da catalase obtido em gel nativo ao fim de 13 d, com duas isoenzimas identificadas: CAT 1 e CAT 2. Foram aplicados 40 μg de proteínas.

A análise densitométrica das bandas da CAT mostrou que a presença do fungicida parece afetar ambas as CAT detetadas de modo idêntico. Assim, para a CAT 1 ocorreu um aumento significativo de cerca 2,1 e 3,9% para as células em suspensão expostas a 71,60 e 143,20 μM do fungicida, respetivamente, enquanto que para a CAT 2 detetaram-se aumentos de cerca de 4,2 e 5,8% para as células expostas a 71,60 e 143, 20 μM , respectivamente.

- APX

Na Tabela 12 é possível constatar que a atividade da APX surgiu significativamente aumentada nas células em suspensão propagadas na presença de Ridomil. As células em suspensão propagadas em 71,60 μM e no dobro desta concentração (143,20 μM), mostraram face à situação controlo, um aumento na atividade da APX de cerca 1,3 e 2 vezes, respetivamente.

Tabela 12 – Quantificação da actividade da APX em culturas de células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL[®], por espectrofotometria, no fim do ciclo cultural (13 d).

Actividade da APX ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
13 d	19,86 \pm 0,273	25,90 \pm 0,371*	40,37 \pm 0,223*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

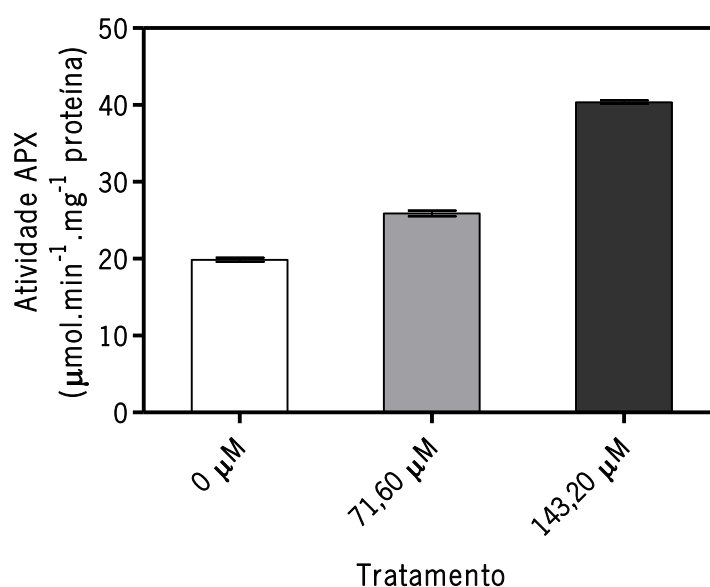


Gráfico 13 – Quantificação da peroxidase do ascorbato em extratos proteicos de células em suspensão cultivadas na ausência e na presença 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

O padrão enzimático da APX em gel nativo foi muito semelhante em todas as situações estudadas. O método colorimétrico revelou a existência de 9 bandas (Fig. 20). A análise densitométrica mostrou que a 1ª banda no gel surgiu com maior atividade nos extratos de células em suspensão propagadas na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, registando-se aumentos de cerca de 52% e 57%, respetivamente, em relação ao controlo. As bandas 4, 5 e 6 mostraram diminuição de cerca de 4, 2 e 3% em relação à situação controlo, para as células em suspensão propagadas na concentração mais elevada do fungicida (143,20 μM).

As bandas 7, 8 e 9, apresentavam em todas as situações experimentais uma intensidade tão reduzida que a sua contribuição para a atividade total da APX não será significativa.

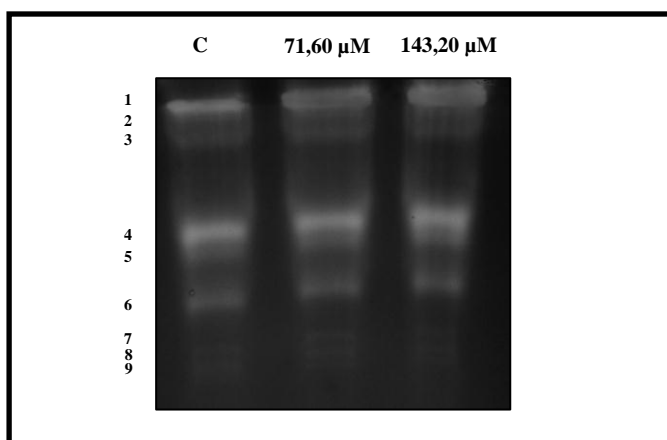


Figura 20 – Avaliação em gel nativo do efeito do Ridomil na atividade da peroxidase do ascorbato nas células em suspensão nos diferentes tratamentos: 0; 71,60 e 143,20 µM de Ridomil. Foram aplicados 20 µg de proteínas.

7. Cromatografia gasosa

As variações nas concentrações de metalaxil foram avaliadas no meio de cultura após filtração das células. Como se pode observar na Tabela 13, logo após as 5 h iniciais de subcultivo, no meio de cultura suplementado com 71,60 µM do fungicida, ocorre uma diminuição de cerca 2,4 vezes na concentração do fungicida. Esta concentração mantém-se inalterada até ao fim do período experimental não sendo observadas variações estatisticamente significativas para os outros tempos de colheita (Tabela 13 e Gráf. 14). No meio de cultura onde as células foram propagadas na concentração mais elevada do fungicida (143,20 µM) uma diminuição de cerca 1,5 vezes foi igualmente observada após 5 h do início do processo de subcultivo. Para esta concentração do fungicida é observada nova diminuição sete dias após o subcultivo, obtendo-se um valor que representa 50% ($72,70 \pm 1,202$ µM) do inicialmente quantificado ($144, \pm 0,646$ µM), e que se manteve praticamente inalterado até ao fim do ciclo cultural (Tabela 13 e Gráf. 14).

De modo a garantir que as variações nas concentrações de metalaxil se deviam exclusivamente à presença das células em suspensão e não de outros factores externos, o metalaxil foi também quantificado em meio de cultura onde não se procedeu ao inóculo das células em suspensão e que foi mantido em condições idênticas às do meio de cultura inoculado com células. Como se

pode observar na Tabela 14, não ocorreram flutuações significativas nas concentrações de metalaxil para ambas as concentrações testadas ao longo do ciclo cultural.

Tabela 13 – Concentrações de metalaxil quantificado em meio de cultura após filtração das células em suspensão propagadas na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®.

Tempo de colheita (h)	[Metalaxil] (mg/L)		
	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
0 h	0,000 \pm 0,000 ^a	83,20 \pm 0,479 ^a	144,9 \pm 0,646 ^a
5 h	0,000 \pm 0,000 ^a	34,90 \pm 1,178 ^b	99,00 \pm 0,882 ^b
7 d	0,000 \pm 0,000 ^a	38,70 \pm 1,302 ^b	72,70 \pm 1,202 ^c
13 d	0,000 \pm 0,000 ^a	36,90 \pm 1,202 ^b	68,90 \pm 1,652 ^c

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

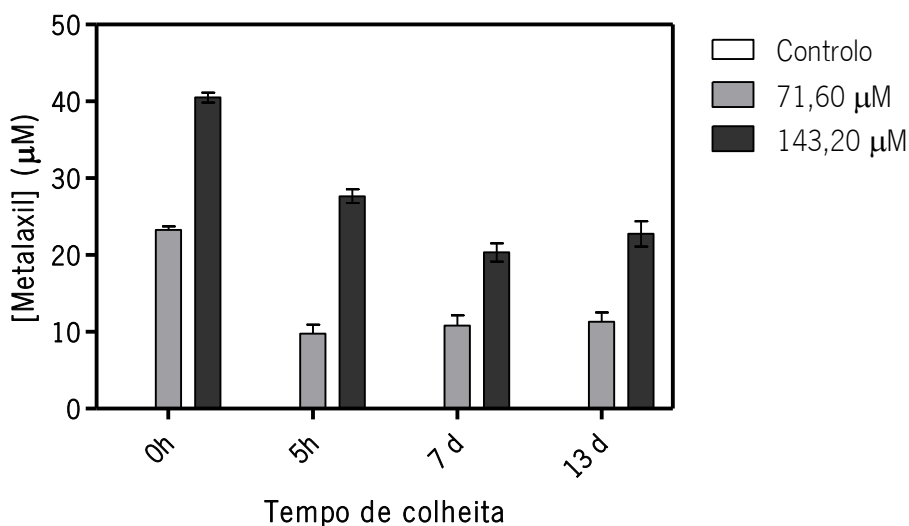


Gráfico 14 – Quantificação do metalaxil em meios de cultura após filtração das células em suspensão cultivadas na ausência e na presença 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

Tabela 14 – Concentrações de metalaxil quantificado em meio de cultura não inoculados mantidos na ausência e na presença de 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil Gold SL®.

[Metalaxil] (mg/L)			
Tempo de colheita (h)	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
0 h	0,000 \pm 0,000 ^a	83,20 \pm 0,479 ^a	144,9 \pm 0,646 ^a
7 d	0,000 \pm 0,000 ^a	78,70 \pm 2,877 ^a	133,6 \pm 1,202 ^a
13 d	0,000 \pm 0,000 ^a	69,10 \pm 0,333 ^a	146,7 \pm 0,577 ^a

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05). Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

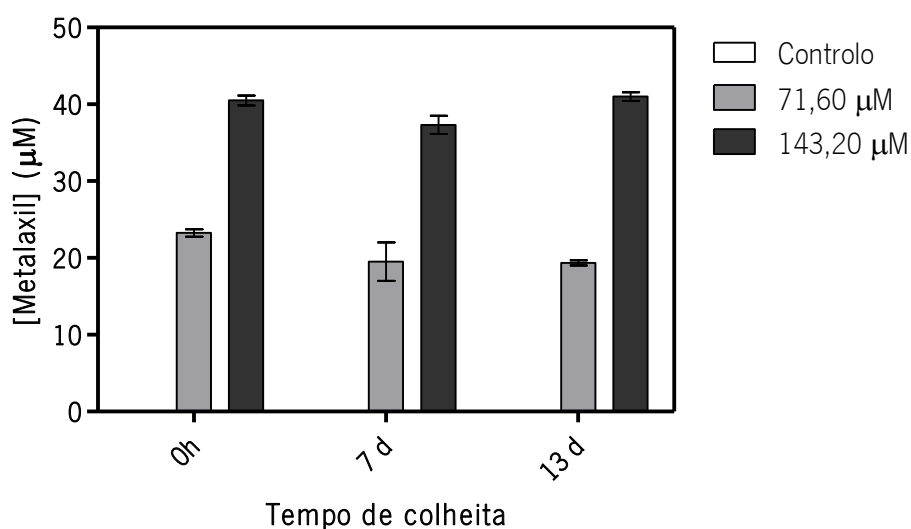


Gráfico 15 – Quantificação do metalaxil em meios de cultura não inoculados mantidos na ausência e na presença 71,60 μM e 143,20 μM de Ridomil, ao fim de 13 d. Valores expressos como médias \pm SEM.

8. Avaliação de parâmetros biométricos de plântulas de *Solanum nigrum* L.

- Germinação de sementes de *Solanum nigrum* L.

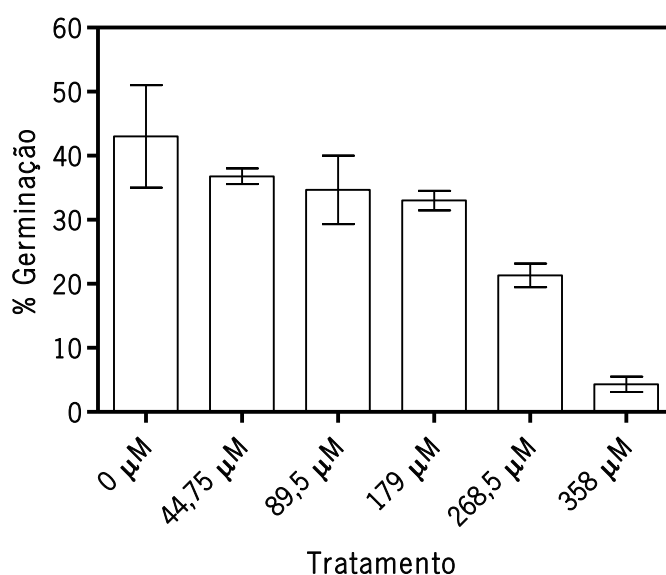
Observando o Gráfico 16 é possível constatar que não foram encontradas diferenças significativas na percentagem de germinação para sementes incubadas em meio nutritivo de Hoagland suplementado com 44,75; 89,5 e 179 μM de Ridomil. Porém um decréscimo na percentagem de germinação foi observado quando as sementes foram incubadas em meio nutritivo suplementado com 268,5 e 358 μM de Ridomil, sendo esse decréscimo de 22% e 39%, respetivamente, em relação à situação controlo (0 μM de Ridomil).

Percentagem de germinação	
Tratamento	
Controlo	43,00 \pm 8,000
44,75 μM	36,50 \pm 1,500
89,5 μM	34,67 \pm 5,333
179 μM	33,00 \pm 1,528
268,5 μM	21,33 \pm 1,856
358 μM	4,333 \pm 1,202

Tabela 15 - Percentagem de germinação de sementes de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Valores expressos como médias \pm SEM (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Gráfico 16 - Percentagem de germinação de sementes de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.



- Comprimento da raiz primária

Um dos parâmetros biométricos avaliados foi o comprimento da raiz das plântulas submetidas às diferentes concentrações de Ridomil. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que o comprimento das raízes decresceu significativamente nas plântulas expostas ao Ridomil para todas as concentrações testadas. No entanto, o decréscimo foi mais pronunciado nas plântulas expostas às concentrações mais elevadas do fungicida. A análise estatística dos resultados mostra que comparativamente ao controlo o comprimento das raízes sofreu um decréscimo de cerca de 1,4; 1,6; 1,6; 1,8 e 3,3 vezes para concentrações de Ridomil de 44,75; 89,5; 179; 268,5 e 358 μM , respetivamente.

Tabela 16 - Comprimento da raiz das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Comprimento da raiz (cm)	
Tratamento	
Controlo	6,560 \pm 0,256
44,75 μM	4,620 \pm 0,256*
89,5 μM	4,160 \pm 0,108*
179 μM	4,140 \pm 0,350*
268,5 μM	3,680 \pm 0,183*
358 μM	1,980 \pm 0,363*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

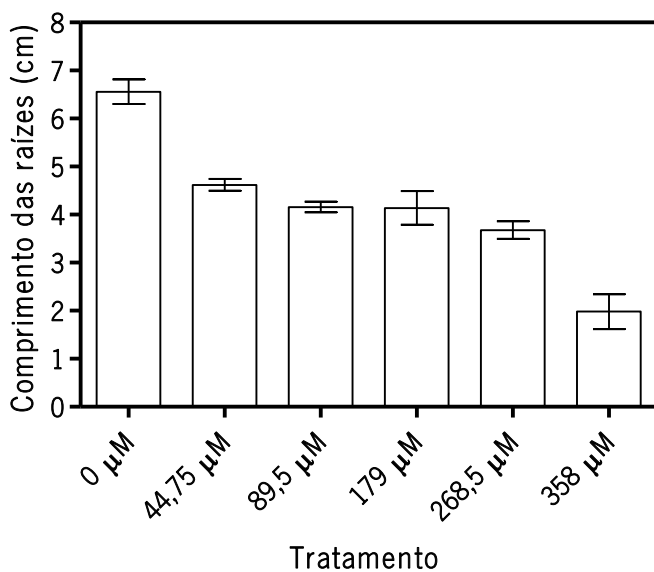


Gráfico 17 - Comprimento da raiz das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

- Comprimento das raízes laterais

Outro parâmetro biométrico avaliado foi o comprimento das raízes laterais das plântulas. Como se pode observar no Gráfico 18, um decréscimo significativo no comprimento das raízes laterais foi observado nas plântulas expostas a concentrações iguais ou superiores a 89,5 μM de Ridomil. Comparativamente à situação controlo, decréscimos significativos no comprimento das raízes laterais de cerca de 1,4; 1,5; 1,5 e 1,8 vezes foram observados para concentrações de Ridomil de 89,5; 179; 268,5 e 358 μM , respetivamente.

Tabela 17 – Comprimento das raízes laterais das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Comprimento das raízes laterais (cm)	
Tratamento	
Controlo	1,350 \pm 0,065
44,75 μM	1,233 \pm 0,194
89,5 μM	0,967 \pm 0,120*
179 μM	0,900 \pm 0,066*
268,5 μM	0,880 \pm 0,139*
358 μM	0,750 \pm 0,082*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

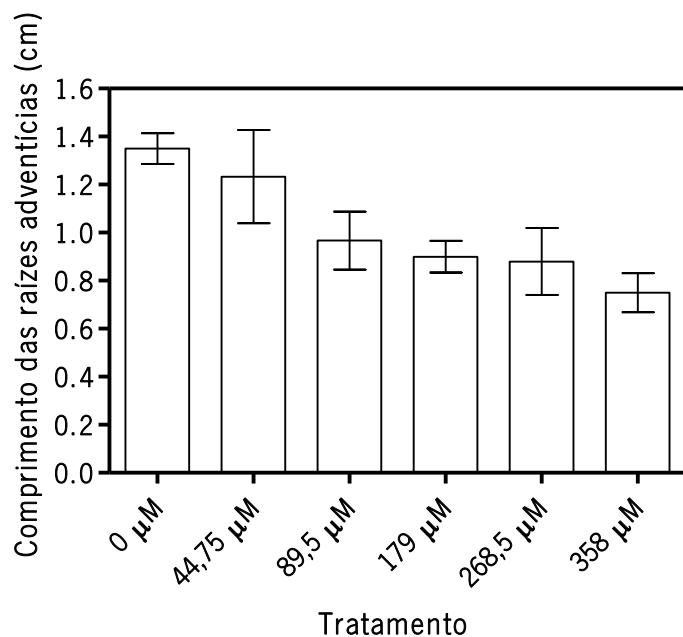


Gráfico 18 – Comprimento das raízes laterais das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

- Altura da parte aérea

A determinação da altura da parte aérea das plântulas permitiu verificar uma variação estatisticamente significativa apenas nas plântulas sujeitas à concentração mais elevada do fungicida utilizada neste estudo (358 μM) (Gráf. 19). Um decréscimo de cerca de 1,5 vezes foi observado nas plântulas de *Solanum nigrum* L. submetidas a 358 μM de Ridomil, em comparação com o controlo. As plântulas sujeitas ao tratamento com as restantes concentrações de Ridomil sofreram na generalidade um decréscimo na altura da parte aérea, ainda que este decréscimo não tenha sido estatisticamente significativo face à situação controlo (Gráf. 19).

Tabela 18 – Altura da parte aérea das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Altura da parte aérea (cm)	
Tratamento	
Controlo	1,300 \pm 0,095
44,75 μM	1,300 \pm 0,084
89,5 μM	1,200 \pm 0,045
179 μM	1,120 \pm 0,037
268,5 μM	1,120 \pm 0,058
358 μM	0,880 \pm 0,058

situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Valores expressos como médias \pm SEM ($n=5$). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da

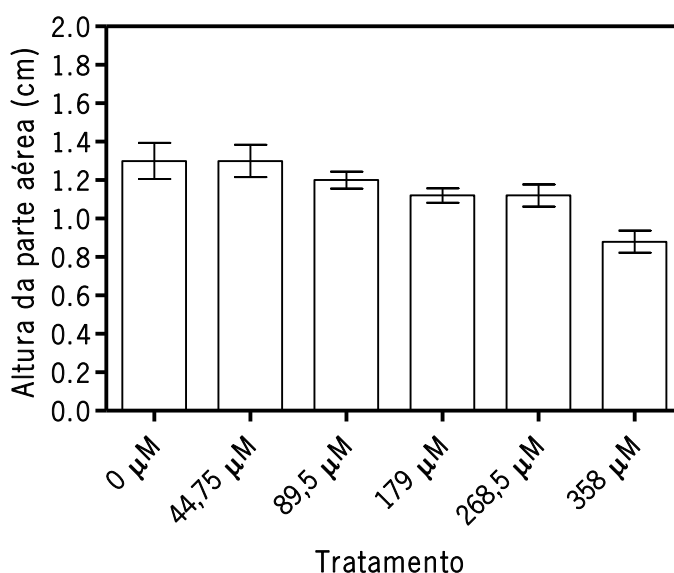


Gráfico 19 – Altura da parte aérea das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

- Número de folhas

O número de folhas foi também contabilizado nas plântulas. A avaliação dos resultados obtidos permitiu verificar um decréscimo significativo no número de folhas em plântulas expostas a concentrações iguais ou superiores a 89,5 μM do fungicida. Macroscopicamente foi também perceptível uma diminuição da área foliar sendo esta diminuição mais notória nas folhas de plântulas expostas a concentrações iguais ou superiores a 179 μM do fungicida. Nestas plântulas foi também mais evidente o desenvolvimento de áreas de clorose e necrose associados a sintomas de senescência foliar. É também de salientar que os sintomas de senescência generalizavam-se a um maior número de folhas à medida que aumentava a concentração do fungicida. Plântulas expostas a 268,5 e 358 μM de Ridomil apresentavam manifestamente um maior enrolamento nas margens das folhas.

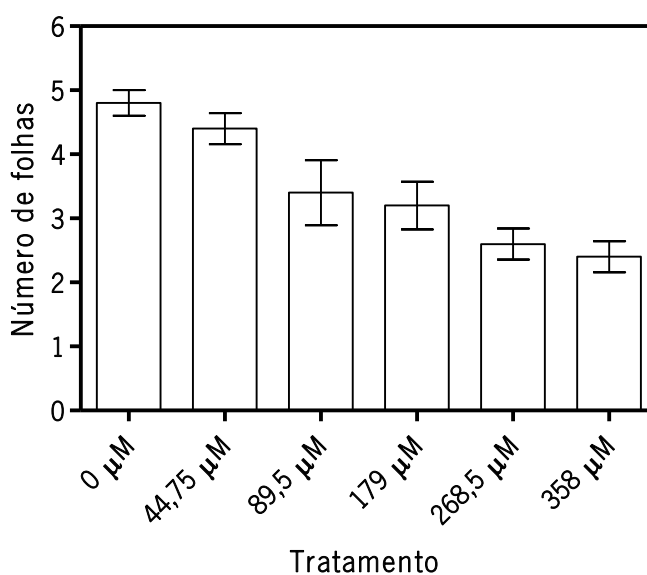
Tabela 19 – Número de folhas das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Número de folhas	
Tratamento	
Controlo	4,800 \pm 0,200
44,75 μM	4,400 \pm 0,245
89,5 μM	3,400 \pm 0,509*
179 μM	3,200 \pm 0,374*
268,5 μM	2,600 \pm 0,245*
358 μM	2,400 \pm 0,245*

situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Valores expressos como médias \pm SEM (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da

Gráfico 20 – Número de folhas das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.



- Biomassa

Analisando o Gráfico 21, é possível verificar um decréscimo significativo na biomassa total de todas as plântulas tratadas com Ridomil. Os valores de biomassa sofreram uma diminuição de cerca de 1,8; 2; 2,1; 2,2 e 4,4, vezes face à situação controlo, quando as plantas foram sujeitas a 44,75; 89,5; 179; 268,5 e 358 μM do fungicida, respetivamente.

Tabela 20 – Biomassa total das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

Biomassa	
Tratamento	
Controlo	44,44 \pm 4,234
44,75 μM	23,96 \pm 1,528*
89,5 μM	22,06 \pm 2,706*
179 μM	21,90 \pm 4,865*
268,5 μM	19,36 \pm 2,271*
358 μM	10,06 \pm 3,085*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

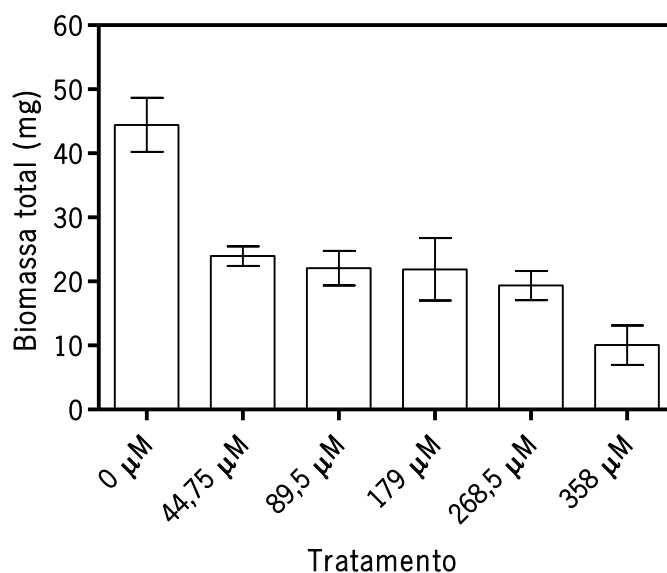


Gráfico 21 – Biomassa total das plântulas de *Solanum nigrum* L. sujeitas a diferentes concentrações de Ridomil.

No fim do período experimental e na data em que se realizaram as avaliações biométricas acima descritas, foi feito um registo fotográfico das plântulas (Fig. 21), onde se pode verificar a redução acentuada e progressiva no crescimento das plântulas sujeitas a concentrações crescentes de Ridomil em relação à situação controlo. A análise da imagem obtida permite constatar que este fungicida terá sido responsável por alterações na morfologia e fisiologia das plântulas.



Figura 21 – Foto de plântulas de *Solanum nigrum* L, submetidas a tratamentos com concentrações crescentes de Ridomil, 28 dias após exposição ao fungicida.

9. Determinações bioquímicas

- Peroxidação lipídica

A análise dos resultados obtidos mostra que os níveis de TBARS nas raízes, não sofreram um aumento significativo comparativamente à situação controlo para a concentração de 44,75 µM. Comportamento diferente foi observado para a concentração mais elevada (89,5 µM) do fungicida, dado que os níveis de TBARS surgiam aumentados cerca de 1,2 vezes face à situação controlo (Tabela 21 e Gráf. 22).

Tabela 21 – Níveis de TBARS quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 µM e 89,5 µM de Ridomil gold SL®.

Níveis de TBARS (nmol/gp.f.)			
Órgão \ Tratamento	Controlo	44,75 µM	89,5 µM
Raízes	1,685 ± 0,054	1,727 ± 0,120	2,064 ± 0,042*
Parte aérea	6,789 ± 0,208	6,882 ± 0,122	7,241 ± 0,388

Valores expressos como médias ± SEM (n=8). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

A parte aérea apresentou aumento nos níveis de TBARS para ambas as concentrações em estudo (44,75 e 89,5 µM), ainda que tais aumentos não sejam estatisticamente significativos.

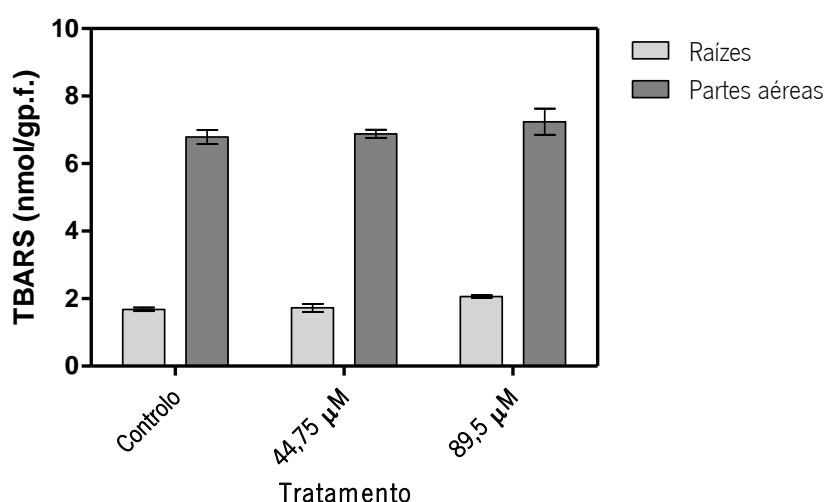


Gráfico 22 – Níveis de TBARS quantificados em raízes e partes aéreas de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.

- Peróxido de hidrogénio

A análise dos resultados presentes na Tabela 22 mostra que nas raízes ocorreu um aumento significativo nos níveis de H₂O₂ de cerca 1,4 vezes para a menor concentração de fungicida testada (44,75 µM), em comparação com o controlo. No entanto, raízes expostas a 89,5 µM do fungicida apresentavam um aumento significativo de cerca 1,3 vezes, comparativamente à situação controlo, ainda que ligeiramente inferior ao quantificado para a concentração mais baixa em estudo (44,75 µM).

Tabela 22 – Níveis de H₂O₂ quantificados em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 µM e 89,5 µM de Ridomil gold SL®.

		Peróxido de Hidrogénio (nmol/gp.f.)		
Órgão	Tratamento	Controlo	44,75 µM	89,5 µM
Raízes		914,9 ± 71,21	1284 ± 26,11*	1261 ± 10,93*
Parte aérea		2678 ± 86,31	3479 ± 98,96*	2298 ± 75,09*

Valores expressos como médias ± SEM (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

Na parte aérea das plantas tratadas com 44,75 µM de Ridomil, foram observados aumentos significativos de cerca 1,3 vezes desta ROS comparativamente com a situação controlo. Um comportamento diferente foi manifestado pela parte aérea de plantas expostas a 89,5 µM do fungicida. Estas apresentavam uma diminuição nos níveis de H₂O₂ de cerca 1,3 vezes, face à situação controlo.

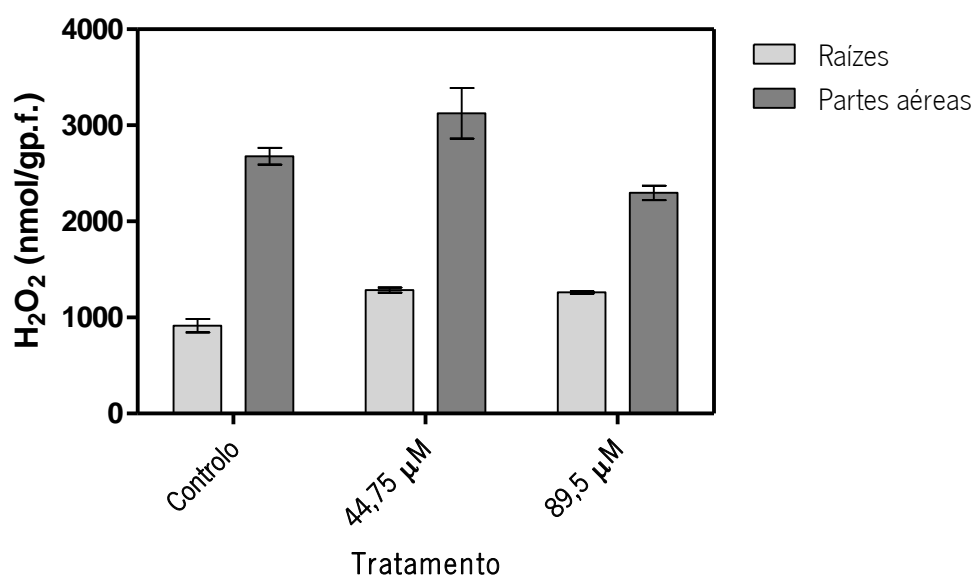


Gráfico 23 – Níveis de H₂O₂ quantificados em raízes e parte aérea de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias ± SEM.

- Prolina

A análise da representação gráfica dos valores obtidos (Gráf. 24), mostra que, relativamente ao controlo, o teor de prolina surgiu significativamente mais elevado (cerca 1,4 vezes) nas raízes tratadas com 44,75 μM de Ridomil. Nas raízes tratadas com 89,5 μM do fungicida não ocorreram flutuações significativas em comparação com o controlo.

Tabela 23 – Teor de prolina quantificado em raízes e parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 μM e 89,5 μM de Ridomil gold SL®.

		Prolina ($\mu\text{g/gp.f.}$)		
Órgão	Tratamento	Controlo	44,75 μM	89,5 μM
Raízes		86,42 \pm 12,31	123,5 \pm 5,997*	63,64 \pm 5,552
Parte aérea		139,2 \pm 4,238	141,8 \pm 4,309	164,8 \pm 9,725*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

O fungicida não provocou alterações significativas no teor médio de prolina na parte aérea das plantas tratadas com 44,75 μM do mesmo. No entanto, aumentos significativos de cerca 1,2 vezes foram observados quando as plantas foram tratadas com 89,5 μM do agroquímico.

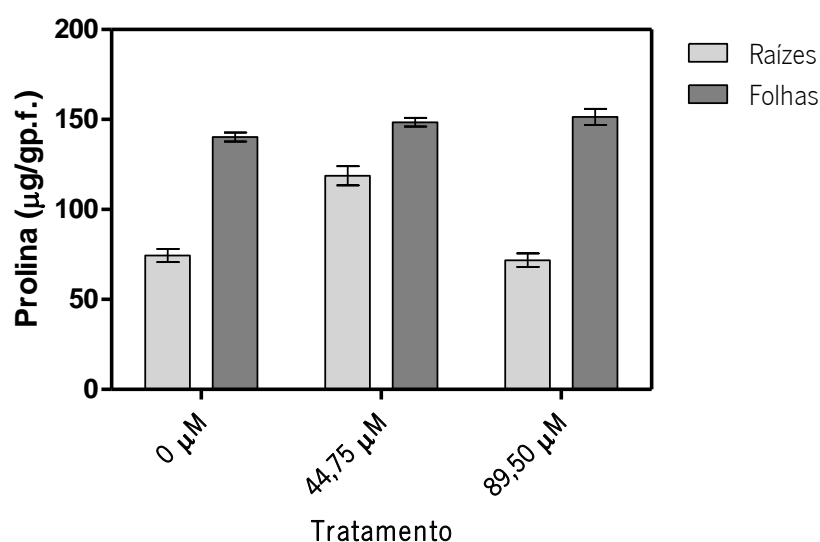


Gráfico 24 – Teor de prolina quantificado em raízes e partes aéreas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®.

Valores expressos como médias \pm SEM.

- Pigmentos fotossintéticos

Os níveis de clorofilas (a+b) foram semelhantes ao controlo quer nas plantas tratadas com 44,75 μ M de Ridomil, quer nas plantas tratadas com o dobro desta concentração (89,5 μ M). Comportamento idêntico foi observado para os níveis de carotenóides (Tabela 24 e Gráf. 25).

Tabela 24 – Pigmentos fotossintéticos quantificados na parte aérea de plantas de *Solanum nigrum* L. cultivadas na ausência e na presença de 44,75 μ M e 89,5 μ M de Ridomil gold SL®.

Pigmentos fotossintéticos (mg/gp.f.)				
Pigmentos	Tratamento	Controlo	44,75 μ M	89,5 μ M
Clorofilas a+b		0,886 \pm 0,030	0,918 \pm 0,030	0,918 \pm 0,097
Carotenóides		0,093 \pm 0,004	0,087 \pm 0,011	0,087 \pm 0,011

Valores expressos como médias \pm SEM (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controlo, para intervalos de confiança de 95% (P<0,05).

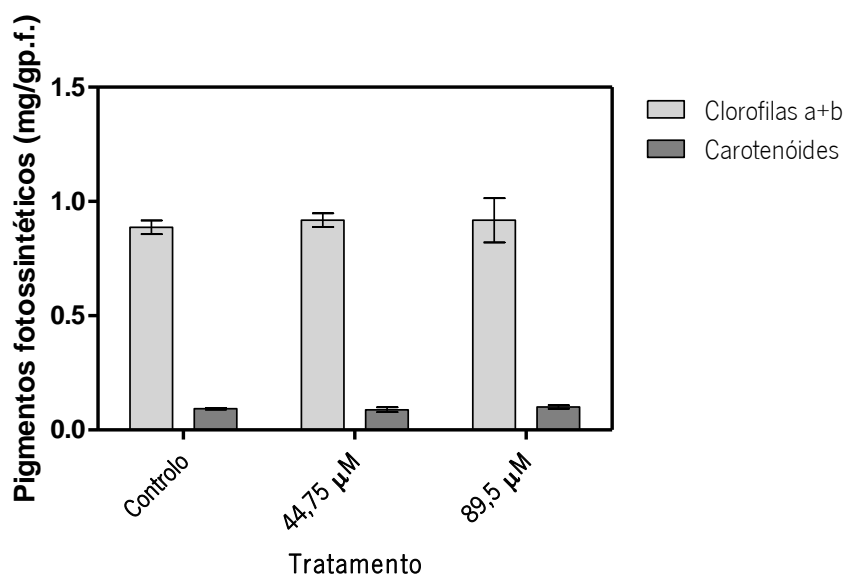


Gráfico X – Variações na quantidade de pigmentos em partes aéreas de plantas de *Solanum nigrum* L., cultivadas na ausência e na presença de duas concentrações distintas de Ridomil Gold SL®. Valores expressos como médias \pm SEM.

- Proteínas solúveis e SDS-PAGE

O teor em proteínas solúveis diminuiu significativamente na parte aérea em todos os grupos de plantas tratadas com Ridomil, comparativamente à situação controle.

O material foliar de plantas tratadas com 44,75 μM de Ridomil exibiu uma diminuição de cerca 1,3 vezes, face à situação controle. Comportamento idêntico (decréscimo de 1,3 vezes) foi observado para as plantas tratadas com 89,5 μM do fungicida.

Tabela 25 – Teor de proteínas solúveis na parte aérea de plantas tratadas com 44,75 μM e 89,5 μM de Ridomil Gold SL®.

Proteínas solúveis ($\mu\text{g/gp.f.}$)			
Tratamento	Controlo	71,60 μM	143,20 μM
	147,7 \pm 3,051	111,7 \pm 1,757*	116,8 \pm 2,374*

Valores expressos como médias \pm SEM (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes dos da situação controle, para intervalos de confiança de 95% ($P < 0,05$).

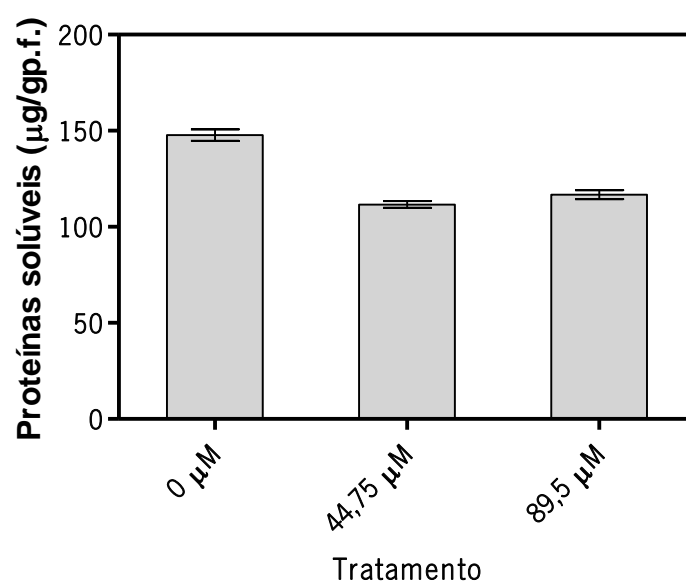


Gráfico 26 – Proteínas solúveis na parte aérea de plantas cultivadas na ausência e na presença de 44,75 e 89,5 μM de Ridomil. Valores expressos como médias \pm SEM.

Apesar de surgirem diferenças nos níveis de proteínas solúveis, o padrão eletroforético obtido por SDS-PAGE, mostrou que não ocorriam alterações qualitativas, mas apenas algumas diferenças quantitativas em determinados polipeptídeos (Fig. 22). Analisando a Fig. 22 é possível constatar que entre os 250 e 130 kDa destaca-se a coloração mais intensa evidenciada pelas bandas polipeptídicas de extratos proteicos de plantas tratadas quer a 44,75, quer a 89,5 μM do fungicida relativamente à situação controlo. A banda polipeptídica com massa molecular mais próxima dos 130 kDa (Fig. 22) surge com uma coloração mais intensa nas plantas tratadas com 44,75 e 89,5 μM do fungicida. A análise ao densitómetro permitiu detetar um aumento de cerca 49% e 32%, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado na banda seguinte onde para as concentrações de 44,75 e 89,5 μM ocorreu um aumento de 52% e 43% na acumulação de polipeptídeos.

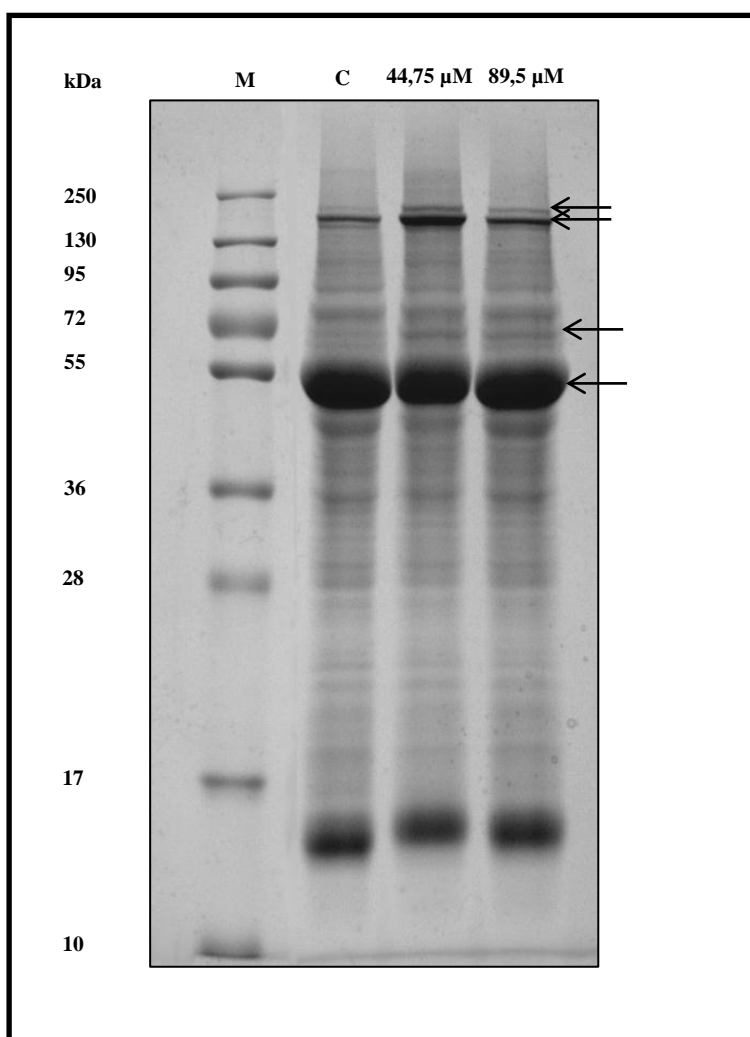


Figura 22 – Padrão de polipeptídeos solúveis de partes aéreas de plantas cultivadas na ausência e na presença de 44,75 e 89,5 μM de Ridomil. Os polipeptídeos foram visualizados no gel através da coloração com azul de Coomassie. M – marcador de massa molecular; setas – polipeptídeos cuja acumulação variou.

Como se pode observar na Fig 22., a banda polipeptídica com massa molecular de cerca 72 kDa surge com uma coloração mais intensa nas plantas tratadas para ambas as concentrações em estudo (44,75 e 89,5 μM), face ao controlo. A análise ao densitómetro permitiu verificar que o aumento na acumulação de polipeptídeos correspondia a 29% e a 34% para as plantas tratadas com 44,75 e 89,5 μM deste composto, respetivamente. A banda polipeptídica com massa molecular de cerca 52 kDa surge com uma diminuição de 18% nas plantas tratadas com 44,75 μM do fungicida, relativamente à situação controlo.

10. Efeitos do Ridomil nos perfis eletroforéticos da SOD, CAT e APX

- SOD

O Ridomil não alterou o zimograma da SOD, onde se identificaram duas isoenzimas de Cu/Zn SOD (SOD5 e 6), três isoenzimas de FeSOD (SOD2, 3 e 4) e uma isoenzima de MnSOD (SOD1) (Fig. 23). A análise densitométrica das bandas mostrou um aumento de 44% na atividade da SOD5 na parte aérea das plantas tratadas com 44,75 μM de Ridomil e de 40% nas plantas tratadas com o dobro desta concentração (89,5 μM). A SOD6 apresentava uma maior atividade nas plantas tratadas com 44,75 μM de Ridomil, correspondendo esse aumento a 42%. Esta mesma banda apresentava um aumento de 38% nas plantas tratadas com a concentração mais elevada do fungicida (89,5 μM).

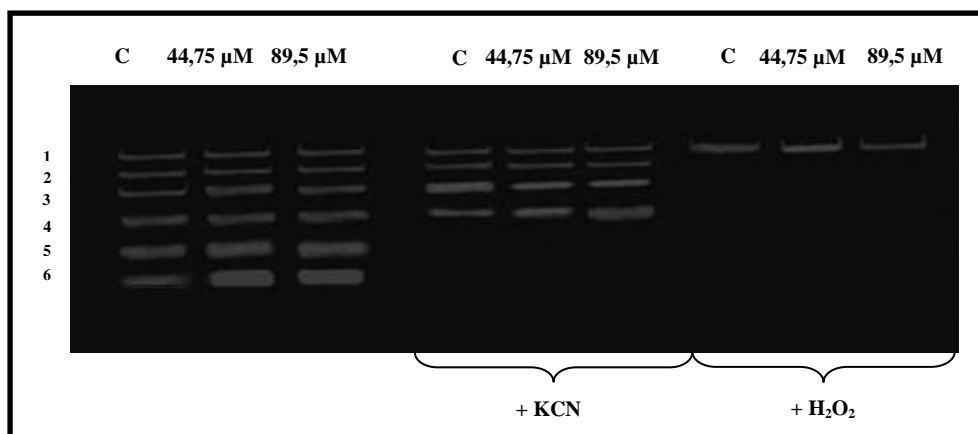


Figura 23 – Efeito do Ridomil na atividade da SOD em gel nativo na parte aérea de plantas sujeitas aos diferentes tratamentos: 0; 44,75 e 89,5 µM em gel nativo. Foram aplicadas 20 µg de proteínas. Foram identificados os seguintes tipos de acordo com os seus inibidores: 1 – MnSOD; 2,3,4 – FeSOD; 5,6 – Cu/ZnSOD.

- CAT

No zimograma da CAT foram identificadas duas isoenzimas: CAT 1 e CAT 2. A análise densitométrica destas bandas mostrou uma diminuição de cerca 46% da CAT 1, nas plantas tratadas com 89,5 µM do fungicida em comparação com o controlo.

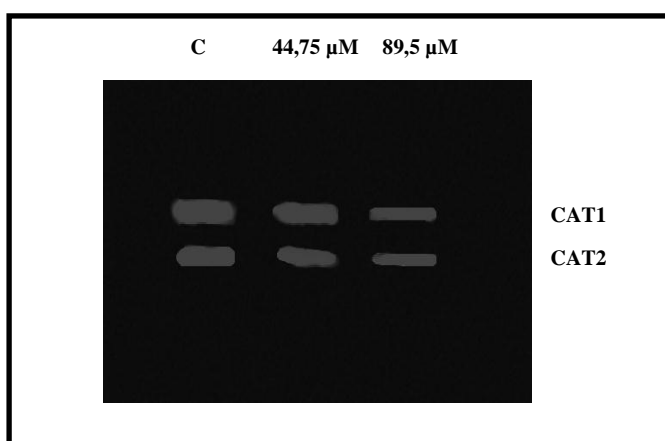


Figura 24 – Atividade da catalase nos diferentes tratamentos das plantas com Ridomil por gel nativo, tendo sido identificadas duas isoenzimas: CAT1 e CAT2. Foram aplicados 25 µg de proteínas.

Uma diminuição de cerca 8% e 37% face à situação controlo foi observada para a CAT2, nas plantas tratadas com 44,75 e 89,5 µM de Ridomil, respetivamente. A análise densitométrica mostrou que a CAT1 é a mais abundante (Fig 24), sendo a diferença entre a CAT1 e a CAT2

correspondente a 32%. A diferença mantém-se nas situações de tratamento, observando-se em 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, aumento de atividade da CAT1 relativamente à CAT 2, de cerca de 22 e 21%, respetivamente.

- APX

No zimograma da APX foram identificadas 5 bandas. A análise densitométrica mostrou que a 1ª banda no gel surgiu com maior atividade nas plantas cultivadas em 89,5 μM de Ridomil, registando-se um aumento de cerca 31%, em relação à situação controlo. Comportamento semelhante foi observado na 2ª e 4ª bandas onde ocorreram aumentos de 29 e 24% na atividade destas bandas da APX nas plantas cultivadas em 89,5 μM do fungicida, face à situação controlo. Relativamente à situação de tratamento das plantas com a concentração mais baixa do fungicida (44,75 μM), não se detetaram diferenças notórias na atividade de qualquer umas das 5 bandas relativamente à situação controlo.

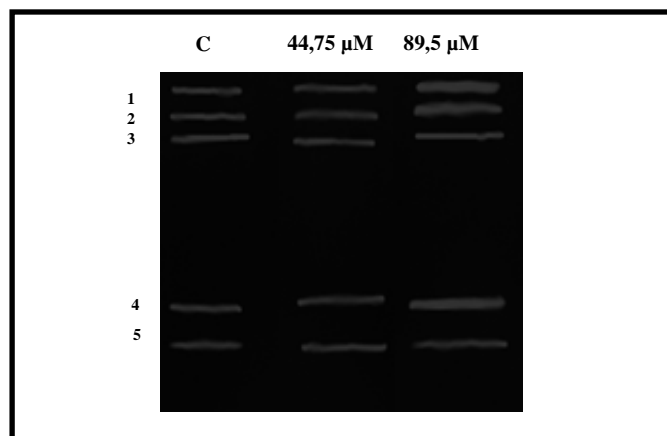


Figura 25 – Atividade da peroxidase do ascorbato determinada em gel nativo para os diferentes tratamentos, com cinco isoenzimas detetadas. Foram aplicados 35 μg de proteínas.

IV. DISCUSSÃO

1. Estudos *in vitro*

A manutenção das culturas em suspensão requer o subcultivo regular e frequente das células para meio fresco. O processo de subcultivo é essencial para sobrevivência das células em suspensão pois em culturas fechadas, fatores externos como a depleção de nutrientes e a acumulação de produtos tóxicos tornam-se limitantes para o crescimento e divisão das células. Dado que o intervalo deste processo depende da espécie vegetal em estudo, é necessário estabelecer uma curva de crescimento para saber o tempo exato de subcultivo da linhagem celular (King, 1984). A curva de crescimento obtida a partir da determinação quer do peso fresco quer do peso seco, mostra a existência de uma fase de latência entre as 0 e as 48 h. Nesta fase, a população celular mantém-se mais ou menos constante, tendo-se observado um pequeno aumento na biomassa não estatisticamente significativo. Durante este período as células encontram-se em fase de adaptação ao meio, ocorrendo por exemplo, a síntese de novas enzimas que podem eventualmente ser necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento e que não se encontram no meio de cultura, ou para a hidrólise ou metabolização dos compostos presentes no meio e que são as únicas fontes de carbono ou azoto, a que o organismo não se encontra adaptado (Chawla, 2009). Entre as 48 e as 216 h verifica-se uma fase de crescimento ativo ocorrendo um aumento significativo da biomassa (fase exponencial). Uma estabilização nos valores da biomassa foi observada entre as 216 e as 264 h (fase de desaceleração), verificando-se posteriormente um decréscimo significativo entre as 264 h até ao fim do ciclo cultural (fase de declínio). Os resultados obtidos permitem inferir que o subcultivo das células em suspensão deve ocorrer entre as 216 e 264 h, de modo a permitir a continuação do crescimento celular. É de referir que nesta curva não foi observada uma fase estacionária perceptível.

Numa fase posterior do estudo curvas de crescimento foram também estabelecidas para as células em suspensão propagadas na ausência (controlo) e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil. Na situação controlo ao contrário do que se verificou anteriormente para a curva de crescimento já estabelecida, não foram observadas as cinco fases de crescimento características das células em suspensão propagadas em sistemas fechados. A biomassa também apresentava valores superiores aos anteriormente obtidos. Isto pode ser explicado pela maior estabilidade da

cultura das células em suspensão, isto é, ao longo do tempo as células em suspensão foram adaptando-se gradualmente ao meio de cultura bem como às condições externas impostas. A curva de crescimento obtida para as células em suspensão propagadas em 71,60 μM de Ridomil exibe uma fase de latência nas primeiras 48 h, que se segue de um aumento até às 216 h. A partir das 216 h ocorre um decréscimo ainda que não estatisticamente significativo até ao fim do ciclo cultural, que pode ser consequência da presença do fungicida no meio de cultura. As células em suspensão propagadas na presença de 143,20 μM de Ridomil exibem uma curva de crescimento semelhante à descrita anteriormente para as células em suspensão propagadas em metade desta concentração (71,60 μM) com duas exceções: um declínio ainda que não significativo nas primeiras 48 h que pode ser interpretado como uma resposta de choque das células à exposição do fungicida e uma diminuição significativa da biomassa às 168 h. Esta diminuição precoce da biomassa admite-se ser a resposta das células à presença do fungicida, dado que este parece exercer um efeito negativo na divisão celular. A curva de crescimento obtida a partir da avaliação do peso seco, não coincide perfeitamente com a curva obtida para o peso fresco. Esta diferença reside sobretudo na alteração não controlada dos parâmetros experimentais como por exemplo, variações de temperatura na estufa.

Na globalidade, a análise dos resultados permitiu verificar que o intervalo de subcultivo da cultura de células em suspensão de *Solanum nigrum* L. deve decorrer na segunda semana, após o processo de subcultivo anterior.

Para analisar o comportamento de uma suspensão celular em termos fisiológicos é necessário avaliar quer os parâmetros de crescimento quer a viabilidade das células em cultura. Neste estudo, o composto utilizado para determinar a viabilidade das células em suspensão foi o azul de tripano. O azul de tripano é um corante de exclusão incapaz de atravessar a membrana citoplasmática de células viáveis. No entanto, durante o processo de morte celular assiste-se à perda da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática pelo que este cromóforo consegue corar componentes internos de células não viáveis (Freshney, 1987). Para os intervalos de tempo considerados (7º e 14º dia), a percentagem de células viáveis foi sempre superior na situação controlo, o que significa que o Ridomil afecta a viabilidade celular das células em suspensão. Verifica-se ainda que entre o 7º e o 14º dia assiste-se a uma diminuição da viabilidade celular no controlo, que pode ser atribuída ao envelhecimento da cultura. O mesmo ocorre nas células propagadas em 71,60 e 143,20 μM do fungicida. Nestes casos a diminuição da viabilidade celular ocorre pela ação conjunta do envelhecimento da cultura e da presença do fungicida, dado

que células em suspensão propagadas em 71,60 μM do agroquímico apresentam uma percentagem de células viáveis mais elevada que as células propagadas no dobro desta concentração. As observações ao microscópio ótico permitiram constatar que a população celular na situação controlo era constituída essencialmente por aglomerados celulares, enquanto que nos tratamentos com 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, esta população era constituída por células isoladas com diferentes morfologias e células filiformes, respetivamente. Estas observações são sugestivas que é a presença de Ridomil a causa principal da diversificação da morfologia celular das populações de células nos diferentes tratamentos.

A peroxidação lipídica é geralmente considerada como indicador de stress oxidativo. Neste estudo verificou-se que os níveis de TBARS para os intervalos de tempo considerados (0 h, 5 h, 7 d e 14 d) são sempre superiores nas células em suspensão tratadas com 71,60 e 143,20 μM de Ridomil, em comparação com a situação controlo. Tal facto indica que o Ridomil é responsável pela indução de stress oxidativo nas células em suspensão. Verificou-se ainda que ao longo do período experimental (0 h, 5 h, 7 d e 14 d) as células em suspensão propagadas nos meios suplementados com Ridomil (71,60 e 143,20 μM), sofriam um aumento progressivo nos níveis das TBARS. Isto mostra que o Ridomil é responsável pela produção de TBARS e consequentemente pelo desencadeamento do stress oxidativo ao longo do período experimental, sendo este mais pronunciado nas células em suspensão propagadas na presença da mais elevada concentração do fungicida. Por outro lado, estudos realizados com plantas de *S. nigrum* tratadas com metalaxil, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TBARS quer em raízes, quer em folhas comparativamente à situação controlo (Teixeira *et al.*, 2011). Embora não existam trabalhos que mostrem o aumento da peroxidação lipídica em sistemas *in vitro* decorrentes da presença de Ridomil no meio de cultura, já foi demonstrado em células em suspensão de *Coffea arabica* L. que os níveis de TBARS aumentam decorrentes da presença de poluentes inorgânicos no meio de cultura, nomeadamente do Cd, Ni e Se (Gomes-Júnior *et al.*, 2006a; Gomes-Júnior *et al.*, 2006b; Gomes-Júnior *et al.*, 2007; Gratão *et al.*, 2008), bem como em células em suspensão de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 expostas ao stress por Cd (Islam *et al.*, 2009). De modo idêntico, foi detetado aumento nos níveis da peroxidação lipídica em células em suspensão de *Pinus pinaster* (Azevedo *et al.*, 2009), bem como em tecido caloso de *S. tuberosum* (Queirós *et al.*, 2007; 2011), em resposta a condições salinas do meio de cultura.

A produção das espécies reactivas de oxigénio foi neste estudo monitorizada pela determinação dos níveis de peróxido de hidrogénio. Os níveis de peróxido de hidrogénio foram sempre mais

elevados para os intervalos de tempo considerados (0 h, 5 h, 7 d e 14 d) nas células tratadas com Ridomil (71,60 e 143,20 μM), face à situação controlo. Tais resultados fornecem evidência experimental da indução de stress oxidativo causada pela presença do fungicida. Além disso, para os intervalos de tempo considerados (0 h, 5 h, 7 d e 14 d) os níveis de peróxido de hidrogénio foram sempre mais elevados nas células em suspensão propagadas na concentração mais elevada de Ridomil (143,20 μM), o que confirma, de facto, a indução de condições oxidativas pela adição do agroquímico. Globalmente, verifica-se que quanto maior a concentração de fungicida presente no meio de cultura, maior é a produção de peróxido de hidrogénio pelas células em suspensão. O aumento da produção desta ROS nestas condições experimentais pode ser resultado da indução de stress oxidativo provocado pela adição do fungicida, mas também pela indução da morte celular. Como foi verificado anteriormente, a perda da viabilidade celular é resultado não só da presença do fungicida, como também do processo de envelhecimento da cultura. Dado que o peróxido é uma molécula sinal envolvida na morte celular (Desikan *et al.*, 2004), os aumentos na concentração de peróxido de hidrogénio podem resultar não só do tratamento das células com Ridomil, como também das vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular que ocorrem durante o envelhecimento da cultura. Também não é de excluir a possibilidade de o aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio decorrer do aumento da atividade catalítica da superóxido dismutase. Os resultados obtidos para os níveis de peróxido de hidrogénio mostram correlação com os obtidos para a peroxidação lipídica (níveis de TBARS), evidenciando no seu conjunto a ocorrência de stress oxidativo decorrente da presença de Ridomil no meio de cultura. Aumento na produção de H_2O_2 é uma resposta que tem sido detetada em plantas sujeitas a várias condições de stress abiótico nomeadamente em plantas tratadas com Zn, Cu, Cd e Fe (Chao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008, Domínguez *et al.*, 2009).

A prolina assume um papel importante no sistema de defesa antioxidante não enzimático. Diversos estudos mostram que este aminoácido confere tolerância a diversos tipos de stress (Szabados & Suvoré, 2009). Neste trabalho é possível verificar que o aumento do teor em prolina é maior nas células tratadas com Ridomil (71,60 e 143,20 μM), em comparação com o controlo, para todos os tempos de colheita (0 h, 5 h, 7 d, 13 d). Também se verifica que ao longo do ciclo cultural, o aumento no teor de prolina é sempre mais elevado nas células propagadas em 143,20 μM do fungicida. Embora durante muito tempo a prolina tenha sido apenas considerada como um importante osmólito compatível com funções protetoras das estruturas subcelulares e macromoléculas em situação de stress osmótico (Szabados & Suvoré, 2009; Gill

& Tuteja, 2010), hoje em dia reconhece-se que a prolina pode influenciar a tolerância ao stress de múltiplas maneiras, sendo considerada como um potente antioxidante e potencial inibidor da morte celular programada (Gill & Tuteja, 2010). De facto, muitos trabalhos indicam que os níveis de prolina aumentam em resposta a diversos fatores de stress. A exposição de tecido caloso de *Solanum tuberosum* L. a elevadas concentrações de NaCl levaram a um aumento acentuado nos níveis de prolina, mostrando a existência de uma correlação positiva entre o conteúdo deste aminoácido e a tolerância salina (Teixeira *et al.*, 2006; Queirós *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Fidalgo *et al.* (2004) onde a exposição de plantas da batateira a 100 e 200 mM de NaCl conduziu a aumentos de 3,5 e 11 vezes, no conteúdo de prolina livre, face à situação controlo. Plantas de arroz submetidas a défices hídricos exibiram um aumento no conteúdo de prolina a nível foliar, estando este aumento relacionado com o aumento da biossíntese das moléculas precursoras deste aminoácido, como a ornitina, a arginina e o ácido glutâmico (Hsu *et al.*, 2003). Estudos utilizando sistemas *in vitro* têm evidenciado, do mesmo modo, este tipo de resposta. De facto, células em suspensão de *Nicotiana sylvestris* L. expostas a elevadas temperaturas (40°C), resultaram num aumento no conteúdo de prolina, que demonstrou estar relacionado com a termotolerância das suspensões celulares (Kuznetsov & Shevyakova, 1997). A acumulação da prolina é atualmente um fenómeno bem conhecido nas plantas ou culturas de tecidos expostos a diversos metais pesados (Szabados & Sauvoré, 2009; Gill & Tuteja, 2010). Estudos realizados por Fornazier *et al.* (2002) mostraram a acumulação de prolina no tecido caloso de *Saccharum officinarum* L. exposto ao cádmio. Comportamento semelhante foi também observado em folhas de *Solanum nigrum* L. após exposição a este metal (Fidalgo *et al.*, 2011). Tendo em consideração os resultados frequentemente documentados na literatura sobre o aumento da prolina em resposta a várias condições de stress ambiental, alguns investigadores têm realizado estudos em culturas *in vitro* e em plantas intactas que mostram que a aplicação exógena de prolina diminui os efeitos deletérios associados a diferentes condições de stress (Islam *et al.*, 2009; Ozden *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Gerdakanah *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010). Estudos realizados em culturas *in vitro* mostram que o conteúdo de prolina pode aumentar devido a uma redução na incorporação deste aminoácido na fração proteica, consequência da diminuição na síntese proteica, ou pode estar associado ao aumento da degradação de proteínas que ocorre em diversas situações de stress (Greenway & Munns, 1980; Ramagopal, 1987; Tsugane *et al.*, 1999). Contudo, no presente estudo verificou-se um aumento significativo nos níveis de proteínas solúveis nas células em suspensão expostas ao Ridomil,

sendo este aumento mais elevado na maior concentração de fungicida testada (143,20 μM). Sendo assim, é plausível admitir que o aumento do teor de prolina deverá corresponder a um incremento na sua síntese. Os resultados obtidos neste trabalho mostram, na sua globalidade, que o Ridomil será o fator responsável pela estimulação da biossíntese deste aminoácido. Segundo alguns autores (Ozden *et al.*, 2009), o papel real de acumulação de prolina, assim como a sua importância fisiológica não está ainda esclarecida, continuando o debate no sentido de se encontrar uma resposta acerca da acumulação de prolina – se é uma reação ao stress abiótico, ou a resposta da planta associada com a tolerância ao stress.

Ao fim de treze dias registou-se um aumento no teor de proteínas solúveis para as células em suspensão propagadas em 143,20 μM de Ridomil. Este resultado poderá ser interpretado como sendo devido principalmente ao aumento da síntese de quatro polipéptidos, pois no SDS-PAGE, quatro bandas com massas moleculares de cerca 116, 52, 37 e 13 kDa, apareciam mais intensamente coradas. Na literatura são frequentes referências a várias proteínas que são sintetizadas em resposta a condições ambientais adversas e que são referidas como “proteínas de stress” (Vierling, 1991). As “proteínas de stress” mais conhecidas surgem em resposta ao stress oxidativo (enzimas antioxidantes) e em resposta a temperaturas elevadas (proteínas de choque térmico) (Burdon, 1993). Considerando estes conhecimentos é plausível admitir que as alterações quantitativas no teor de proteínas solúveis são consequência do tratamento com o fungicida. O aumento das proteínas solúveis está de acordo com os resultados obtidos para atividade específica das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). Na verdade, foi observado um aumento na atividade destas enzimas que pode estar relacionado com este aumento de proteínas solúveis.

Aumentos na atividade total da SOD foram observados nas células em suspensão propagadas em Ridomil, no fim do ciclo cultural (13º dia). As células em suspensão propagadas em 143,20 μM do fungicida apresentavam aumentos na atividade total desta enzima antioxidante superiores aos exibidos pelas células propagadas em metade desta concentração (71,60 μM). Isto sugere que o Ridomil é o fator responsável pelo aumento na atividade total da SOD. Este aumento na atividade da SOD está concordante com os resultados obtidos para a quantificação do H_2O_2 , dado que o H_2O_2 é um dos produtos formados no processo de dismutação do O_2 catalisado por esta enzima. A análise da atividade da SOD em gel nativo permitiu igualmente verificar que a atividade da enzima surgia aumentada nos extratos das células em suspensão submetidas ao tratamento com Ridomil e, do mesmo modo que os resultados obtidos para a quantificação espectrofotométrica da

atividade total, também a atividade em gel mostrou, que na generalidade, estes aumentos eram mais acentuados nos extratos das células propagadas na concentração mais elevada do fungicida (143,20 μ M). O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia consoante a espécie vegetal (Gratão *et al.*, 2005), tendo sido neste estudo identificadas sete isoenzimas distintas. A banda SOD3 classificada como MnSOD mostrou um aumento de atividade nas células tratadas com Ridomil. Esta banda foi claramente aquela que mais contribui para o aumento da atividade total da SOD, principalmente nas células tratadas com o Ridomil. Neste mesmo material vegetal detetou-se aumento de atividade para a SOD4 e a SOD5 também classificadas como MnSOD. O aumento na atividade da SOD pode ser interpretado como um meio de as células atenuarem os efeitos nocivos do stress oxidativo, imposto pela presença do Ridomil no meio de cultura. As MnSOD localizam-se essencialmente nos peroxissomas e nas mitocôndrias. Neste estudo foram detetadas no total sete MnSOD, o que seria de esperar dado que as células em suspensão foram mantidas em condições de obscuridade. A banda SOD6 classificada como FeSOD foi detetada nos extratos de células em suspensão. Esta banda exibiu um aumento de atividade em resposta ao tratamento com o Ridomil, mostrando que as SOD férricas cuja localização se resume essencialmente aos plastídios se encontram ativas e aptas a responder a situações de stress oxidativo, neste caso imposto pela presença de Ridomil. Como as células foram mantidas em condições de obscuridade, o aumento de atividade em resposta ao tratamento com Ridomil foi hipoteticamente dado pelas FeSOD localizadas em leucoplastos ou outros plastídios não fotossintéticos. A SOD7 classificada como Cu/ZnSOD mostrou também um aumento de atividade em resposta ao Ridomil. Este tipo de SOD é muito abundante no citosol, cloroplastos e mitocôndrias. Assim, seria provável admitir a existência de mais isoformas nas células em suspensão de *Solanum nigrum* L..

No fim do ciclo cultural (13º dia), aumentos na atividade total da CAT foram observados para as células em suspensão propagadas em Ridomil, sendo estes aumentos mais elevados na maior concentração de fungicida utilizada (143,20 μ M), de um modo idêntico ao observado para a SOD. O aumento na atividade da CAT pode estar associado com o aumento nos níveis de H₂O₂ resultantes da elevada atividade da SOD. Estes resultados indicam que a CAT encontra-se envolvida nos processos de defesa das células contra o stress oxidativo imposto pelo Ridomil. O estudo do padrão da atividade da catalase, em gel nativo, mostrou que o tratamento das células em suspensão com 71,60 e 143,20 μ M de Ridomil aumentou a atividade da CAT1 e da CAT2, sendo este aumento mais notório nas células propagadas na maior concentração do fungicida

(143,20 μM). Isto sugere que o tratamento das células com o fungicida induz a ativação das enzimas do sistema antioxidante, neste caso específico a catalase. Para todos os tratamentos verificou-se uma maior atividade da CAT2. Estudos realizados por Fidalgo *et al.* (2011) mostraram que a CAT2 tem maior atividade nas raízes de *Solanum nigrum* L. do que a CAT1. Sabendo que as células em suspensão e as raízes têm em comum o facto de não realizarem a assimilação fotossintética do carbono, parece plausível admitir que a CAT2 é a isoenzima preferencialmente expressa nos órgãos não fotossintéticos. Foram realizados trabalhos que, visaram avaliar o padrão de acumulação de mRNAs da CAT1 e da CAT2 em vários órgãos de *Solanum tuberosum* L. A análise por de “Northern blotting” mostrou haver uma maior acumulação dos transcritos da CAT2 em relação à CAT1 em órgãos não fotossintéticos como os brotos, as pétalas, e as raízes das plantas de batateira. A utilização de anticorpos anti-CAT1 e anti-CAT2 identificaram nos géis a CAT1 como a banda de menor mobilidade e a CAT2 como a banda de maior mobilidade. A análise de géis nativos mostrou uma maior atividade da CAT2 relativamente à CAT1 nos pecíolos, brotos e raízes da batateira, sendo esta a única isoenzima detetada nos tubérculos desta planta (Santos *et al.*, 2006). A avaliação conjunta de todos os resultados permitiu concluir que em *S. tuberosum* a CAT1 parece estar associada à fotorrespiração, apesar de também ser expressa em alguns órgãos não fotossintéticos. Ao contrário, a CAT2 parece estar envolvida em diversas funções como a atividade glicoxissomal, em folhas senescentes, defesa e outros processos, em órgãos não fotossintéticos. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os referidos por Santos *et al.* (2006). De facto, também a banda CAT2 foi a que mostrou maior atividade e aquela que mais acentuadamente respondeu ao stress imposto pela presença de Ridomil no meio de cultura. Em adição, noutros trabalhos relacionados, a exposição de plantas de batateira a radiações UV bem como o fornecimento de 100 mM de H_2O_2 às folhas destacadas de *S. tuberosum*, resultaram num aumento da expressão e atividade da CAT2 (Santos *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005). Estudos de imunolocalização realizados por Santos *et al.* (2004) mostraram que a localização subcelular da CAT2 restringe-se unicamente às inclusões cristalinas presentes nos peroxissomas, e o trabalho de Almeida *et al.* (2005) demonstrou que o aumento da expressão e da atividade da CAT2 em resposta a elevados níveis de H_2O_2 exibia uma correlação positiva com o aumento do número de peroxissomas nas folhas. Tais resultados indicam que em situações de stress a CAT2 é sintetizada *de novo* e que encontra-se envolvida na defesa de *S. tuberosum* contra situações adversas que resultem num incremento dos níveis intracelulares de H_2O_2 .

No que diz respeito à APX a sua atividade aumentou, no fim do ciclo cultural (13º dia), nas células em suspensão submetidas ao tratamento com Ridomil, sendo este aumento mais significativo na maior concentração de fungicida utilizada. A principal função da APX é a degradação rápida do H_2O_2 no seu local de formação, sendo os principais produtos de oxidação das reações catalisadas pela APX o radical monodesidroascorbato e o seu principal produto de oxidação espontânea, o desidroascorbato (Asada, 1997). Dado que os níveis de H_2O_2 apresentam a concentração mais elevada no 13º dia, era de esperar um aumento da atividade da APX, dado que esta molécula apresenta grande afinidade para a molécula de H_2O_2 . O H_2O_2 pode também ter induzido o aumento na atividade da APX, recorrendo às suas funções de molécula sinalizadora. O estudo do padrão da atividade da APX, em gel nativo, mostrou que o tratamento das células com Ridomil afetou algumas isoenzimas da APX em ambas as concentrações testadas.

Tanto a CAT como a APX estão envolvidas na conversão do H_2O_2 a H_2O . Dado que os níveis de H_2O_2 aumentam ao longo do ciclo cultural, atingindo valores máximos no 13º dia para ambas as concentrações testadas (71,60 e 143,20 μM), seria de esperar que a atividade da CAT e da APX também aumentasse, mostrando uma resposta positiva do sistema antioxidante ao stress oxidativo provocado pela presença do fungicida no meio de cultura. Assim, a proliferação das células em suspensão nos meios de cultura suplementados com Ridomil, deve-se muito provavelmente à ativação dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos (SOD, CAT e APX) e não enzimáticos (prolina).

São muitos os trabalhos realizados com várias espécies vegetais e em diferentes situações de stress abiótico que mostram aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e/ou peroxidase do ascorbato, ambas responsáveis por eliminar o peróxido de hidrogénio. Estudos realizados por Andrade *et al.* (2009, 2010) mostraram que as atividades da APX e da CAT surgiram aumentadas em resposta à presença de Cu e de Zn em *Canavalia ensiformis* L. micorrizadas e não micorrizadas, e mais recentemente, resposta semelhante (aumento na atividade de ambas as enzimas – CAT e APX), foi observada em plantas de tomateiro expostas a Zn (Sbartai *et al.*, 2011). Já em células em suspensão de *Coffea arabica* L. a atividade total da CAT aumentou em resposta ao Cd, enquanto que o comportamento da APX variou com a concentração de Cd no meio de cultura (Gomes-Júnior *et al.*, 2006). Resultados opostos foram observados no estudo realizado por Islam *et al.* (2009), quando células em suspensão de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 eram expostas ao stress por Cd. Neste trabalho, os autores

detetaram decréscimos na atividade quer da CAT, quer da SOD, enquanto a atividade da peroxidase do guaiacol aumentou.

Uma diminuição de cerca 50% na concentração do metalaxil foi observada nos meios de cultura 5 horas após o processo de subcultivo para ambas as concentrações testadas (71,60 e 143,20 μM). Esta redução na concentração de metalaxil mostra que as células em suspensão são capazes de acumularem e/ou degradarem este composto. A confirmação destes resultados surgiu quando as mesmas concentrações iniciais de metalaxil foram adicionadas a matrizes onde não se havia procedido ao inóculo com células em suspensão e que foram mantidos nas mesmas condições físicas. Nestes meios de cultura verificou-se que não ocorreram variações nas concentrações do metalaxil ao longo do período experimental. Ao fim dos treze dias as concentrações observadas eram de 71,60 e 143,20 μM . Estes resultados confirmam que a acumulação e/ou degradação de metalaxil se deviam exclusivamente à presença das células em suspensão.

2. Estudos *in vivo*

Concentrações de Ridomil iguais ou superiores a 268,5 μM exerciam um efeito negativo na germinação de sementes de *Solanum nigrum* L. Até ao momento já foram detetados solos contaminados por concentrações de metalaxil superiores a 236 ppb (EPA, 1994). Nestes casos, a germinação das sementes será totalmente inibida, pelo que é necessário encontrar outros métodos de colonização para que esta planta possa entrar em esquemas de fitorremediação de metalaxil nestes solos. Decréscimos significativos no comprimento das raízes primárias foram observados em todas as concentrações de Ridomil testadas. Observando estes resultados é plausível admitir que o fungicida é o fator responsável por estas reduções, até porque os decréscimos são mais pronunciados nas plântulas expostas às concentrações mais elevadas do fungicida. Estudos realizados por Kummerová *et al.* (2008) mostram que a determinação do comprimento das raízes pode ser considerado como um parâmetro de avaliação do efeito do composto orgânico em teste nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas. Concentrações de Ridomil iguais ou superiores a 89,5 μM provocam decréscimos significativos no crescimento das raízes laterais, observando-se que quanto maior é a concentração aplicada de fungicida, maior é o decréscimo observado no comprimento das mesmas. As auxinas e as citocininas estimulam a divisão celular controlando componentes específicos do ciclo celular como as cínases dependentes das ciclinas (CDKs) (Taiz & Zeiger, 2010). O Ridomil possivelmente poderá interferir

com as vias de sinalização destas fito-hormonas, o que resulta numa redução no comprimento das raízes secundárias. Já a determinação da altura da parte aérea permitiu verificar um decréscimo significativo apenas no tratamento com 358 μM de Ridomil e aliando com o facto de ocorrer diminuição no número de folhas em todas as plantas tratadas, podemos admitir que este composto interfere com os processos morfogénéticos envolvidos na proliferação da parte aérea. A possível acumulação do Ridomil nas folhas leva a uma redução na área foliar a partir de concentrações iguais ou superiores a 89,5 μM . O aparecimento dos sintomas de senescência podem estar relacionados com a produção de ROS desencadeada pela presença deste fungicida nas folhas. A biomassa diminuiu em todos os conjuntos de plântulas tratadas com Ridomil. O decréscimo da biomassa total das plântulas poderá ser devido sobretudo à diminuição do comprimento das raízes quando expostas ao Ridomil, o que demonstra o efeito prejudicial deste fungicida no desenvolvimento das plântulas.

Na globalidade, estes resultados mostram que a concentração de 358 μM de Ridomil foi a única que provocou alterações significativas em todos os parâmetros biométricos analisados, indicando que este nível de fungicida utilizado provocou efeitos nefastos no crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Uma das principais consequências do stress oxidativo é a peroxidação lipídica (Halliwell & Chirico, 1993). Assim, com o objetivo de verificar se as plantas tratadas com Ridomil sofreram dano oxidativo, procedeu-se à quantificação das TBARS, que resultam da oxidação dos ácidos gordos poliinsaturados existentes nas membranas biológicas. Foi possível verificar para todas as situações experimentais que a parte aérea das plantas exibiram níveis mais elevados de TBARS do que as raízes. Estes resultados podem ser explicados pelo facto das folhas serem órgãos fotossintéticos, que, quando expostos à luz conduzem inevitavelmente à formação de ROS, sendo estas as responsáveis pelos aumentos na peroxidação lipídica (Taiz & Zeiger, 2010). Na parte aérea das plantas submetidas aos diferentes tratamentos com Ridomil, não se verificaram alterações significativas nos níveis de TBARS. Estes dados sugerem que o dano oxidativo sofrido pelas plantas, como resultado da exposição ao metalaxil levou à ativação dos sistemas de defesa antioxidantes. No que diz respeito à parte radicular, variações significativas nos níveis de TBARS ocorreram somente nas raízes das plantas expostas à concentração mais elevada do fungicida (89,5 μM). Possivelmente esta concentração é demasiado tóxica nestes órgãos levando à diminuição e/ou inativação das enzimas e metabolitos dos sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Já vimos anteriormente que para esta concentração o comprimento

da raiz primária sofre um decréscimo acentuado, facto que se admite estar associado com estas alterações.

Independentemente da situação experimental, foi possível verificar que a parte aérea possuiu níveis mais elevados de H_2O_2 do que as raízes, situação que pode ser explicada pelo facto das folhas serem órgãos fotossintéticos, que, quando expostos à luz, originam excesso de energia que por sua vez culminam na formação de ROS, como é o caso do H_2O_2 . Observando os resultados obtidos verifica-se que a menor concentração de fungicida (44,75) induz um aumento nos níveis de H_2O_2 . Pelo contrário a concentração de 89,5 μM já reduz a formação desta ROS, que pode ser devida ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes envolvidas na sua remoção (CAT e APX) e/ou da ativação da morte celular resultante da fitotoxicidade patente na utilização de níveis tão elevados do fungicida. Como verificado anteriormente, a biomassa total das plântulas diminuía a partir de concentrações iguais ou superiores a 44,75 μM , o que vem a confirmar estes resultados. Comportamento semelhante é observado para as raízes, daí as anteriores constatações serem também válidas para estes órgãos. O aumento nos níveis de H_2O_2 em resposta à presença de contaminantes orgânicos já foi descrito na literatura. Trabalhos realizados por Singh *et al.* (2006) mostraram que a presença de fenóis em culturas de raízes capiliformes de *Brassica juncea* levavam a um aumento nos níveis celulares de H_2O_2 . O aumento nos níveis de H_2O_2 podem estar relacionados com os sintomas de senescência verificados nas folhas das plântulas de *S. nigrum*, dado que esta ROS encontra-se envolvida no processo de morte celular programada.

Uma acumulação nos níveis de prolina foi manifestada na parte aérea das plantas tratadas com Ridomil. Como já anteriormente referido, a prolina está envolvida nos processos de defesa antioxidante, sendo talvez este um dos motivos pelos quais os níveis de peróxidos lipídicos se mantêm constantes e os níveis de H_2O_2 diminuem. Os aumentos verificados no teor de prolina livre nestes tecidos podem ser resultado da estimulação da sua síntese, redução da incorporação deste aminoácido na fração proteica, motivada pela diminuição da síntese de proteínas, e/ou resultado do aumento da degradação de proteínas que possuam resíduos de prolina na sua constituição. Pelo contrário, nas raízes assiste-se a um decréscimo no teor deste aminoácido o que poderá estar relacionado com o aumento nos níveis das TBARS.

Observando os resultados obtidos para os pigmentos fotossintéticos, não se verificaram flutuações significativas nos níveis dos mesmos. Talvez devido ao efeito protetor conferido pela prolina, as concentrações de fungicida testadas não foram suficientemente elevadas para que

ocorresse degradação das clorofilas. No entanto e como já foi anteriormente referido, os níveis de H_2O_2 quantificados na parte aérea das plantas sujeitas a estas mesmas concentrações de Ridomil podem ser suficientes para desencadear processos de morte celular programada associados aos sintomas de senescência visualizados nas folhas das plântulas. Estudos realizados por Fidalgo (1995), mostraram que a aplicação de Ridomil® MZ 72 na concentração de 0,25% (p/v) a plantas de batateira era responsável pelo aparecimento precoce de sintomas de senescência foliar e redução nos níveis de clorofilas.

A diminuição das proteínas solúveis parece ser consequência da presença do fungicida, dado que para a concentração mais elevada o decréscimo nos níveis de proteínas solúveis é mais acentuado, ou seja, verifica-se a ocorrência de uma correlação negativa entre a concentração de Ridomil e o teor proteico quantificado na parte aérea. A diminuição nos níveis de proteínas solúveis pode consequência da estimulação da degradação de proteínas envolvidas no metabolismo do azoto e no processo fotossintético. Ainda que sendo menos provável, a diminuição de proteínas solúveis pode resultar da degradação de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante, devido ao elevado dano oxidativo exposto pelo tratamento com o fungicida.

A análise do padrão eletroforético (SDS-PAGE) mostrou que o tratamento com Ridomil estimulou a síntese de alguns polipeptídeos com massas moleculares entre os 250 e 130 kDa e entre os 72 e 55 kDa. A banda polipeptídica com massa molecular de 55 kDa, deve corresponder à subunidade maior da rubisco. Na verdade, a rubisco é a proteína solúvel mais abundante das proteínas solúveis totais das plantas, representando cerca de 50% das proteínas solúveis totais (referências em Fidalgo, 1995). A análise densitométrica mostrou que nas plantas tratadas com 44,75 μM de Ridomil ocorreu um decréscimo na acumulação da referida subunidade, admitindo-se que esta redução possa estar associada à sua degradação. Observando os resultados obtidos para a quantificação das proteínas solúveis e considerando que o fungicida é responsável por uma aceleração da senescência, podemos admitir que a coloração mais intensa evidenciada por alguns polipeptídeos sejam proteínas cuja síntese foi estimulada, pelo próprio processo de senescência ou devido ao aumento da síntese das chamadas “proteínas de stress” que surgem em resposta a condições ambientais alteradas, ou seja, neste caso, ao stress imposto pelo Ridomil.

A superóxido dismutase é considerada a primeira linha de defesa contra as ROS, sendo responsável pela dismutação do anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Mittler *et al.*, 2004). Neste estudo verificou-se que somente as bandas SOD5 e SOD6 classificadas como

MnSOD respondem ao tratamento com o Ridomil. Estas bandas exibem aumentos de atividade mais elevados na concentração de fungicida correspondente a 44, 75 μM , o que coincide com os resultados obtidos para o H_2O_2 que também são mais elevados para esta concentração. Pelo contrário, uma diminuição na atividade destas mesmas SODs é visível para a maior concentração de fungicida (89,5 μM) empregue, verificando-se uma concomitante redução nos níveis de H_2O_2 . A catalase e a peroxidase do ascorbato são as principais enzimas envolvidas na desintoxicação do H_2O_2 . Observando os resultados obtidos verifica-se uma diminuição nos níveis de atividade da CAT, sendo essa redução mais pronunciada nas plantas tratadas com a concentração mais elevada do fungicida. Na verdade, diversos estudos mostram que esta enzima é rapidamente inativada em situações de stress severo (Hertwing *et al.*, 1992; Feirabende *et al.*, 1992), sendo esta situação a que parece ocorrer neste estudo, tomando em consideração os resultados obtidos. Para todos os tratamentos verifica-se que a CAT1 é a isoforma predominante. De facto, estudos realizados por Santos *et al.* (2006), em que foi feita a caracterização das catalases da batateira, mostram que a CAT1 é a principal isoenzima presente em folhas de *S. tuberosum*. Os resultados obtidos neste estudo estão assim de acordo com os obtidos no trabalho de Santos *et al.* (2006).

A enzima responsável pela redução dos níveis de H_2O_2 foi principalmente a APX, dado que se verificou um aumento da sua atividade na concentração mais elevada do fungicida (89,5 μM). Atendendo ao comportamento desta enzima, e tendo presente que a sua função é também a de eliminar o H_2O_2 tal como a catalase, é possível admitir que o aumento na atividade da APX compensou a redução nos níveis de atividade da CAT.

A ausência de peroxidação lipídica na parte aérea das plantas mostra que de facto, os sistemas antioxidantes se encontram ativos, participando na remoção efetiva das ROS.

V. CONCLUSÕES

Neste trabalho procurou-se induzir a produção de células em suspensão de *S. nigrum* a partir de culturas estabelecidas de tecido caloso e avaliar o efeito de um fungicida correntemente utilizado na prática agrícola, designado por Ridomil, no metabolismo das células em suspensão, de modo a caracterizar as respostas que decorrem a nível celular, ao stress imposto pela presença desse fungicida no meio de cultura.

- As células em suspensão propagadas em 71,60 e 143,20 μM de Ridomil apresentaram uma redução na biomassa e na viabilidade relativamente ao controlo, sendo essa diminuição mais acentuada nas células mantidas na concentração mais elevada do fungicida.
- A exposição das células em suspensão ao fungicida levou à ocorrência de stress oxidativo. Foi detetado um aumento na produção de ROS, que se manifestou num aumento das TBARS e nos níveis do H_2O_2 ao longo do ciclo cultural, sendo os valores mais elevados obtidos no fim do ciclo cultural (13 d). Os resultados obtidos a partir da quantificação das TBARS e do H_2O_2 permitem concluir que a produção de ROS foi mais elevada nas células expostas à concentração mais elevada do fungicida (143,20 μM).
- A exposição das células em suspensão ao Ridomil conduziu a um aumento nos níveis de prolina, verificando-se que as células expostas a 143,20 μM do fungicida acumularam níveis mais elevados de prolina do que as células propagadas na menor concentração do mesmo (71,60 μM), ao longo do ciclo cultural, atingindo valores mais elevados no fim do ciclo cultural (13 d).
- O teor de proteínas solúveis aumentou em resposta à aplicação de Ridomil, sendo esse aumento significativo apenas na concentração mais elevada do fungicida (143,20 μM). O padrão eletroforético obtido por SDS-PAGE revelou em qualquer um dos tratamentos (0; 71,60 e 143,20 μM) apenas diferenças quantitativas.
- O Ridomil estimulou a atividade total das enzimas do sistema antioxidante: SOD, CAT e APX. A atividade destas enzimas era sempre mais elevada na maior concentração de fungicida utilizada (143,20 μM).

- O estudo da atividade da SOD em gel nativo mostrou que as células em suspensão de *S.nigrum* apresentavam os três tipos da enzima SOD – cinco MnSOD, uma FeSOD e uma Cu/ZnSOD.
- O zimograma da catalase mostrou duas isoenzimas da catalase, a CAT 1 e a CAT 2. Em todos os tratamentos (0; 71,60 e 143,20 μM) realizados foi possível verificar que a CAT 2 era a mais abundante.
- A APX exibiu um zimograma muito semelhante em todas as situações em estudo (0; 71,60 e 143,20 μM), contabilizando um total de nove isoenzimas para cada tratamento.
- A quantificação do metalaxil em meios de cultura após filtração das células em suspensão cultivadas na ausência e na presença de 71,60 e 143,20 μM de Ridomil permitiu verificar um decréscimo para cerca de metade das concentrações iniciais nas células tratadas, 5 h após o subcultivo das células para meio fresco, sendo esta diferença mantida até ao fim do ciclo cultural (13 d).

Com o objetivo de avaliar o grau de correlação existente entre a resposta das culturas de células em suspensão (sistema *in vitro*) e a resposta de plantas intactas crescidas em hidroponia (sistema *in vivo*), foram feitos estudos semelhantes na parte aérea e nas raízes de *S. nigrum*. Esta componente do trabalho permitiu verificar que:

- O Ridomil provocou vários efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento das plântulas de *S. nigrum*, observável em diversos aspectos biométricos avaliados.
- Na parte aérea das plantas não foram observadas flutuações significativas nos níveis de TBARS, tendo sido no entanto observado aumentos nos níveis de H_2O_2 para ambas as concentrações de fungicida testadas (44,75 e 89,5 μM). O Ridomil também não provocou alterações no teor clorofilino.

- A aplicação de Ridomil às plantas resultou numa diminuição no teor de proteínas solúveis na parte aérea; no entanto, o padrão eletroforético revelou apenas a ocorrência de algumas alterações quantitativas.
- Ocorreu aumento no teor de prolina que foi observado apenas na parte aérea de plantas tratadas com Ridomil, evidenciando o envolvimento do sistema de defesa antioxidante não enzimático nas respostas das plantas ao fungicida.
- Três tipos da enzima SOD foram identificados na parte aérea das plantas – uma MnSOD, três FeSOD e duas Cu/ZnSOD.
- Na parte aérea das plantas de *S. nigrum* foram identificadas duas isoenzimas da catalase, a CAT 1 e a CAT 2. Em ambos os tratamentos (44,75 e 89,5 μM) realizados foi possível verificar que a CAT 1 era a mais abundante.
- O zimograma da APX obtido para a parte aérea das plantas em estudo mostrou um padrão muito semelhante para ambos os tratamentos (44,75 e 89,5 μM), contabilizando um total de cinco isoenzimas para cada.
- Nas raízes de *S. nigrum* verificou-se um aumento nos níveis de TBARS, bem como nos níveis de H_2O_2 . Nestes órgãos não se verificou uma resposta protetora do sistema antioxidante não enzimático, dado que os níveis de prolina diminuíram.

O conjunto de resultados obtidos com as culturas de células em suspensão de *S. nigrum* e com as plantas intactas, mostra que o grau de correlação existente entre o sistema *in vitro* e o sistema *in vivo* não é muito elevado, pelo que não parece ser plausível utilizar o sistema *in vitro* como modelo experimental para o estudo das respostas fisiológicas e bioquímicas de *S. nigrum* face à aplicação de Ridomil.

VI. Perspetivas futuras

- Quantificar o metalaxil nas células em suspensão de modo a saber se este composto se acumula no interior das células ou se estas secretam enzimas degradativas para o meio de cultura. Caso este composto se acumule no interior das células seria de interesse estudar a sua via degradativa, no entanto, se as células secretam enzimas degradativas para o meio de cultura seria de interesse realizar um SDS-PAGE utilizando como amostra o próprio meio de cultura e após revelação observar diferenças qualitativas existentes, que poderiam ser sequenciadas revelando a sua identidade.
- Realizar RT-PCR para avaliar os níveis de acumulação dos mRNAs específicos que codificam as enzimas do sistema antioxidante, a fim de estabelecer correlações ou diferenças entre os transcritos e a totalidade de proteína expressa, contribuindo para uma melhor compreensão da resposta e regulação do sistema antioxidante.

BIBLIOGRAFIA

Abhilash, P., Jamil, S., Singh, N. (2009). Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology advances*. 27: 474-488.

Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 51: 167-173.

Akubugwo, I., Obasi, A., Ginika, S. (2007). Nutritional Potential of the Leaves and Seeds of Black Nightshade *Solanum nigrum* L. Var *virginicum* from Afikpo-Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 6: 323-326.

Alkorta, I., Garbisu C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*. 79: 273-276.

Almeida, J., Fidalgo, F., Confraria, A., Santos, A., Pires, H., Santos, I. (2005). Effect of hydrogen peroxide on catalase gene expression, isoform activities and levels in leaves of potato sprayed with homobrassinolide and ultrastructural changes in mesophyll cells. *Functional Plant Biology*. 32: 707-720.

Andrade, S., Gratão, P., Schiavinato, M., Silveira, A., Azevedo, R., Mazzafera, P. (2009). Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere*. 75: 1363-1370.

Andrade, S., Gratão, P., Azevedo, R., Silveira, A., Schiavinato, M., Mazzafera, P. (2010). Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*. 68: 198-207.

Alscher, R., Erturk, N., Heath, L. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1331-1341.

Alvarez, P., Illman, W. (2006). *Bioremediation and natural attenuation – Process fundamentals and mathematical models*, vol 1, (ed. John Wiley & Sons), New Jersey, pp: 300-360.

Amako, K., Chen, G., Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiology*. 35: 497-504.

Arora, A., Sairam, K., Srivastava, C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82:1227-1238.

Asada, K. (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants, *In*: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. (J.G. Scandalios, ed.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp: 527-568.

Azevedo, H., Amorim-Silva, V., Tavares, R. (2009). Effect of salt on ROS homeostasis, lipid peroxidation and antioxidant mechanisms in *Pinus pinaster* suspension cells. *Ann. For. Sci.* 66: 211p2-211p9.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-207.

Benov, L. (2001). How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma*. 217: 33-36.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*. 72: 319-321.

Bray, E., Bailey-Serres, J., Weretilnyk. (2000). Responses to abiotic stress, *In*: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (B. B. Buchanan, W. J. Gruissem, L. Russell, eds), American Society of Plant Physiologists, pp: 1158-1202.

Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J., Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161: 405-414.

Brooks, R., Chambers, M., Nicks, L., Robinson, B. (1998). Phytomining. *Trends in Plant Science*. 3:359-362.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (ed. American Society of Plant Biologists), Rockville, pp: 578-580, 1189-1191.

Burdon, RH. (1993). Heat shock proteins in relation to medicine. *Mol Aspects Med*. 14: 83-165.

Burkan, G., Schnoor, L. (1996). Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J. Environ. Eng.* 122: 958-963.

Campanella, B., Bock, C., Schröder, P. (2002). Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs – Potential and limitations. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 9: 73-85.

Chao, Yue-En., Zhang, M., Tian, Sheng-ke., Lu, Ling-Li., Yang, Xiao-e. Differential generation of hydrogen peroxide upon exposure to zinc and cadmium in hyperaccumulating plant specie (*Sedum alfredii* Hance). *Journal of zhejiang university – Science B*. 9: 243-249.

Charles S. A., Halliwell, B. (1980). Effect of hydrogen peroxide in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose bisphosphatase. *Biochemical Journal*. 189: 373-376.

Chawla, H. (2009). *Introduction to plant biotechnology*, (ed. Science Publishers, Inc), Enfield (NH), USA, pp: 71-89.

Clare, D.A., Duong, M.N., Darr, D., Archibald, F., Fridovich, I. (1984). Effects of molecular oxygen on detection for superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Analytical Biochemistry*. 140: 532-537.

Cunningham, S., Berti W. (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 207-212.

Delaplace, P., Fauconnier, M-L., Jardin, Patrick. (2011). ROS as biomarkers in hyperhydricity, *In: Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants* (S. Dutta Gupta, ed.), Science publishers, pp: 151-176.

Desikan, R., Cheung, Man-Kim., Bright, J., Henson, D., Hancock, J., Neill, S. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany*. 55: 205-212.

Dominguez, D., Santiago, R., Garcia, F. (2009). Modulation of the antioxidative response of *Spartina densiflora* against iron exposure. *Physiologia Plantarum*. 136: 169-179.

Donahue, J., Okpodu, C., Grabau, E., Alschér, R. (1997). Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology*. 113: 249-257.

Doran, P. (2009). Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnology and Bioengineering*. 103: 60-76.

Edmonds, J., Chweya, J. (1997). *Black nightshades – Solanum nigrum and related species*, (ed. International Plant Genetic Resources Institute), Rome, Italy, pp. 9, 28-31, 56-59.

EPA, 1994. Reregistration eligibility decision (RED) – metalaxyl. In: True, L.P. (Ed.), Prevention, Pesticides and Toxic Substances. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Feierabend, J., Schaaf, C., Hertwig, B. (1992). Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*. 100: 1554-1561.

Fernandez-Garcia, N., Garcia de la Garma, J., Olmos, E. (2011). ROS as biomarkers in hyperhydricity, *In: Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants* (S. Dutta Gupta, ed.), Science publishers, pp: 249-274.

Fidalgo, F., Santos, I., Salema, R. (1991). Biochemical aspects of field grown potato plants treated with ridomil. *IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress*.

Fidalgo, F. (1995). *Tratamento de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo*. PhD thesis. Universidade do Porto, Porto.

Fidalgo, F., Santos, I., Salema R. (1998). Nitrate and nitrite reductase activities and nitrate level in potato plants treated with a fungicide mixture. *5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation*.

Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I., Salema, R. (2004). Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Ann. appl. Biol.* 145: 185-192.

Fidalgo, F., Freitas, R., Ferreira, R., Pessoa, A., Teixeira, J. (2011). *Solanum nigrum* L. antioxidant defence system isozymes are regulated transcriptionally and posttranslationally in Cd-induced stress. *Environmental and Experimental Botany*. 72: 312-319.

Fornazier, R., Ferreira, R., Pereira, G., Molina, S., Smith J., Lea, P., Azevedo, R. (2002). Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 71: 125-131.

Foyer, C. & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 21-25.

Foyer, C. & Noctor, G. (2001). The molecular biology and metabolism of glutathione, *In*: Significance of glutathione to plant adaptation to the environment (D. Grill *et al*, ed.), Kluwer Academic Publishers, pp: 27-56.

Freshney, R. (1987) *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, Alan R. Liss, Inc., New York. pp: 117.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 1203-1209.

Frugoli, J., Zhong, H., Nuccio, M., McCourt, P., McPeck, M., Thomas, T., McClung, C. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*. 112: 327-336.

García, P., Rivero, R., Ruiz, J., Romero, L. (2003). The Role of Fungicides in the Physiology of Higher Plants: Implications for Defense Responses. *The Botanical Review*. 69: 162-172.

Gerdakanah, M., Mozafari, A., Khalighi, A., Sioseh-Mardah, A. (2010). The effects of exogenous proline and osmotic stress on morpho-biochemical parameters of strawberry callus. *African Journal of Biotechnology*. 9: 3775-3779.

Gerhardt, K., Huang, X-D., Glick, B., Greenberg, B. (2009). Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. *Chemosphere*. 70: 982-989.

Gill, S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 909-930.

Gomes-Junior, R., Moldes, C., Delite, F., Pompeu, G., Grato, P., Mazzafera, P., Lea, Peter., Azevedo, R. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*. 65: 1330-1337.

Gomes-Junior, R., Moldes, C., Delite, F., grato, P., Mazzafera, P., Lea, P., Azevedo, R. (2006). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 420-429.

Gomes-Junior, R., Grato, P., Gaziola, S., Mazzafera, P., Lea, P., Azevedo, R. (2007). Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology*. 34: 449-456.

Grace, S. (2005). Phenolics as antioxidants, *In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (N. Smirnoff ed.), Blackwell Publishing, pp: 53-86.

Gratão, P., Pompeu, G., Capaldi, F., Vitorello, V., Lea, P., Azevedo, R. (2008). Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 94: 73-83.

Greenway, H., Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Reviews Plant Physiology*, 31: 149-190.

Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition.* 57: 715-724.

Hassanein, A., Soltan, D. (2000). *Solanum nigrum* is a model system in plant tissue and protoplast cultures. *Biologia Plantarum.* 43: 501-509.

Hertwig, B., Steb, P., Feierabend, J. (1992). Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology.* 100: 1547-1553.

Hussey, N.W. (1983). Some factors affecting pesticide usage, *In: Pest and disease control handbook* (N. Scopes & M. Ledieu ed.), The British Crop Protection Council, pp: 1-13.

Hsu, S., Hsu, Y., Kao, C. (2003). The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum.* 46: 73-78.

Islam, M., Hoque, Md., Okuma, E., Banu, Mst., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y. (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology.* 166: 1587-1597.

Kaul, S., Sharma, S., Mehta, I. (2005). Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from *in vitro* assays. *Amino acids.* 34: 315-320.

King, P. (1984). Induction and maintenance of cell suspension cultures, *In: Cell culture and somatic cell genetics of plants: Laboratory procedures and their applications*, Vol 1. (Vasil, I.K. ed.), Academic Press, New York, pp: 130-138.

Krieger-Liszkay, A., Trebst, A. (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1677-1684.

Kucerová, P., Macková, M., Chromá, L., Burkhard, J., Triska, J., Demnerová, K., Macek, T. (2000). Metabolism of polychlorinated biphenyls by *Solanum nigrum* hairy root clone SNC-90 and analysis of transformation products. *Plant and Soil*. 225: 109-115.

Kumar, N., Pal, M., Singh A., SaiRam, R., Srivastava, G. (2010). Exogenous proline alleviates oxidative stress and increase vase life in rose (*Rosa hybrida* L. 'Grand Gala'). *Scientia Horticulturae*. 127: 79-85.

Kummerová, M., Vánová, L., Krulová, J., Zezulka, S. (2008). The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere*. 71: 2005-2059.

Kuznetsov, V., Shevyakova, N. (1997). Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum*. 100: 320-326.

Laloi, C., Apel, K., Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 323-328.

Lichtenthaler, HK. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*. 149: 350-382.

Macek, T., Kotrba, P., Suchova, M., Skacel, F., Demnerova, K., Ruml, T. (1994). Accumulation of cadmium by hairy-root cultures of *Solanum nigrum*. *Biotechnology Letters*. 16: 621-624.

Macek, T., Macková, M., Kás, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology advances*. 18: 23-34.

Marques, A., Oliveira, S., Samardjieva, A., Pissarra, J., Rangel, O., Castro, M. (2007). *Solanum nigrum* grown in contaminated soil: Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environmental pollution*. 145: 91-699.

Matthews, G. A. (2006). *Pesticides: health, safety, and the environment*, (ed. Blackwell Publishing Professional), Oxford, UK, pp. 1-8.

Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 82: 525-532.

Meagher, R. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 153-162.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*. 9: 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). The reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci*. 9: 490-498.

Mullineaux, P. & Creissen, G. (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress, *in*: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses (J. Scandalios ed.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp. 667-713.

Munne-Bosch, S., Penuelas, J., Llusia, J. (2007). A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed *NahG* transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science*. 172: 756-762.

- Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*. 119: 163-168.
- Pereira, R., Camps-Arbestain, M., Garrido, B., Macías, F., Monterroso, C. (2006). Behaviour of α -, β -, γ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*. 144: 210-217.
- Peuke, A., Rennenberg H. (2005). Phytoremediation. *EMBO reports*. 6: 497-501.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- Pilon-Smits, E., Freeman, J. (2006). Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Front Ecol Environ.* 4: 203-210.
- Ramagopal, S. (1987). Salinity stress induced tissue-specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiology*, 84:324-331.
- Roberts, T., Hutson, D. (1999). *Metabolic pathways of agrochemicals. Part II- Insecticides and Fungicides*, (ed. Royal Society of Chemistry), Cambridge, UK, pp. 1269-1270.
- Quan, Li-Juan; Zhang, B; Shi, Wei-Wei; Li, Hong-Yu. (2008). Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 2-18.
- Queirós, F., Rodrigues, J., Almeida, J., Almeida, D., Fidalgo, F. (2011). Differential responses of the antioxidant defence system and ultrastructure in salt-adapted potato cell line. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 1410-1419.
- Queirós, F., Fidalgo, F., Santos, I., Salema, R. (2007). *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia plantarum*. 51: 728-734.

Rennenberg, H. (2001). Glutathione – an ancient metabolite with modern tasks, *In: Significance of glutathione to plant adaptation to the environment* (D. Grill *et al*, ed.), Kluwer Academic Publishers, pp: 1-11.

Río, L., Corpas, F., Sandalio, L., Palma, J., Gómez, M., Barroso, J. (2002). Reactive oxygen species, antioxidante systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1255-1272.

Sandermann, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17: 82-84.

Sandermann, H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: The green liver concept. *Pharmacogenetics*. 4: 225-241.

Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J., Salema, R. (2004). Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*. 167: 925-935.

Santos, I., Pires, H., Almeida, J., Fidalgo, F., Confraria, A., Duarte, M., Borlido, J., Salema, R. (2006). Phylogenetic relationship of potato CAT1 and CAT2 genes, their differential expression in non-photosynthetic organs and during leaf development, and their association with different cellular processes. *Functional Plant Biology*. 33: 639-651.

Sbartai, H., Djebar, M., Rouabhi, R., Sbartai, I., Berrebbah, H. (2011). Antioxidant response in tomato plants *Lycopersicon esculentum* L. roots and leaves to zinc. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 3: 41-46.

Scandalios, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.

Scandalios, J.G., Guan L., Polidoros, A.N. (1997). Catalase in plants: gene structure, properties, regulation and expression, *In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (J. Scandalios ed.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp. 343-406.

Schnoor, J., Licht, L., McCutcheon, S., Wolfe, N., Carreira, L. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental science & technology*. 29: 318-323.

Sharma, S., Dietz, K-J. (2006). The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*. 57: 711-726.

Singh, S., Melo, J., Eapen, S., D'Souza, S. (2006). Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂. *J. Biotechnol.* 123: 43-49.

Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions, *in*: Antioxidants and reactive oxygen species in plants (N. Smirnoff ed.), Blackwell Publishing, pp: 53-86.

Subroto, M., Priambodo, S., Indrasti, N. (2007). Accumulation of Zinc by Hairy Root Cultures Of *Solanum nigrum*. *Biotechnology*. 6: 344-348.

Sukul, P., Spiteller, M. (2000). Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 164: 1-26.

Sun, R., Zhou, Q., Sun, F., Jin, C. (2007). Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* (L.). *Environmental and Experimental Botany*. 60: 468-476.

Szabados, L. & Savouré, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15: 89-97.

Taiz, L., Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland.

Temple, M., Perrone, G., Dawes, I. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *TRENDS in Cell Biology*. 15: 319-326.

Teixeira, J., Pereira, S., Queirós, F., Fidalgo, F. (2006). Specific roles of potato glutamine synthetase isoenzymes in callus tissue grown under salinity: molecular and biochemical responses. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 87: 1-7.

Teixeira, J., de Sousa, A., Azenha M., Moreira, J., Fidalgo, F., Silva, A., Faria, J., Silva, A. (2011). *Solanum nigrum* L. weed plants as a remediation tool for metalaxyl-polluted effluents and soils. *Chemosphere.* 85: 744-750.

Tsugane, K.; Kobayashi, K.; Niwa, Y.; Ohba, Y.; Wada, K; Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11: 1195-1206.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.

Vranová, E., Inzé, D., Breusegem, V. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany.* 53: 1227-1236.

Xiang, C., Werner, B., Christensen, M., Oliver, David. (2001). The Biological Functions of Glutathione Revisited in *Arabidopsis* Transgenic Plants with Altered Glutathione Levels. *Plant Physiol.* 126: 564-574.

Xu, J., et al. (2009). Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* (L.). *Plant Cell Rep.* 28: 325-333.

Ware, G. (2000). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, vol. 164, (ed. Springer-Verlag), New York, pp. 1-26.

Wei, S., Zhou, Q., Koval, PV. (2006). Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their significance to phytoremediation. *Science of the total environment.* 369: 441-446.

Willekens, H., Langebartels, C., Tiré, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 91: 10450-10454.

Wollgiehn, R., Bräutigam, E., Schumann, B., Erge, D. (1984). Effects of metalaxyl on the synthesis of RNA, DNA and protein in *Phytophthora nicotianae*. *Z. Allg Mikrobiol.* 24: 269-279.

Wonisch, W., Schaur, R. (2001). Chemistry of glutathione, *in*: Significance of glutathione to plant adaptation to the environment (D. Grill et al, ed.), Kluwer Academic Publishers, pp: 1-11.

Zhang, H., Xia, Y., Wang, G., Shen, Z. (2008). Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta*. 227: 465-475.